

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



# **ESTUDO MOLECULAR DE DOENTES COM DISLIPIDEMIA FAMILIAR**

**Tânia Afonso Rocha Simão Branco dos Santos**

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



# **ESTUDO MOLECULAR DE DOENTES COM DISLIPIDEMIA FAMILIAR**

**Tânia Afonso Rocha Simão Branco dos Santos**

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

DISSERTAÇÃO ORIENTADA PELA DOUTORA MAFALDA BOURBON (INSA) E  
PELA PROFESSORA DOUTORA ANA CRESPO (FCUL)

2008

## **Agradecimentos**

A conclusão desta dissertação marca o final de mais uma etapa na minha vida académica. Muitas foram as pessoas que me ajudaram, incentivaram e inspiraram durante este período da minha vida. A todas elas o meu mais sincero agradecimento.

À Doutora Mafalda Bourbon, agradeço a oportunidade que me deu de realizar este trabalho. A sua boa orientação e empenho para que esta dissertação tivesse êxito foi essencial para a concretização deste objectivo.

À Professora Doutora Ana Crespo, agradeço a sua orientação e disponibilidade para discutir comigo aspectos importantes desta dissertação.

Às minhas colegas e amigas do Grupo de Investigação Cardiovascular, Ana Medeiros, Catarina Alves e Vânia Francisco, agradeço todo o apoio que me deram ao longo deste período. Os conhecimentos e força positiva que me transmitiram foram para mim essenciais.

A todos os estagiários e bolseiros do Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas, agradeço o excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram, onde o bom relacionamento interpessoal e a cooperação estiveram sempre presentes.

Ao Rui, agradeço toda a compreensão, apoio e incentivo sem os quais seria impossível ultrapassar alguns momentos difíceis.

À minha mãe, agradeço todo o amor, apoio e dedicação. Agradeço todos os sacrifícios que fez para que eu pudesse atingir este objectivo e toda a força positiva que sempre me transmitiu ao longo da vida. Sem ela seria impossível chegar até aqui.

Ao meu pai, agradeço todo o amor, compreensão e incentivo. É para mim uma fonte de inspiração. Obrigada por despertar em mim, desde pequena, a curiosidade de saber sempre mais.

Ao meu irmão Gonçalo, a pessoa mais importante da minha vida, quero agradecer a compreensão e pedir desculpa por estar um pouco ausente neste período. Espero que este trabalho o inspire no futuro e que o motive a prosseguir os seus estudos com empenho e dedicação.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha avó Beatriz por tudo aquilo que é e representa para mim. Quero agradecer todo o carinho, amor e dedicação que sempre teve para comigo e por ter sido a base da minha formação enquanto pessoa.

## Resumo

A lipase lipoproteica (LPL) desempenha um papel fundamental no metabolismo dos trigliceridos, sendo responsável pela sua hidrólise em ácidos gordos e glicerol. Alterações neste gene têm sido verificadas em doentes com Deficiência Familiar em LPL (FLLD) e Dislipidemia Familiar Combinada (FCHL), conduzindo a uma perda total ou parcial da funcionalidade da enzima. Os doentes afectados por estas dislipidemias apresentam geralmente hipertrigliceridemia, que vários estudos demonstram ser um factor de risco independente para doenças cardiovasculares. Frequentemente estes doentes sofrem de episódios recorrentes de pancreatite aguda. Algumas apolipoproteínas também têm sido relacionadas com os níveis séricos de trigliceridos e o gene *USF1* (*Upstream Transcription Factor 1*) parece estar envolvido na FCHL.

O objectivo deste estudo é identificar alterações genéticas responsáveis pela hipertrigliceridemia em doentes com suspeita clínica de FLLD e doentes com fenótipo sugestivo de FCHL, recorrendo ao estudo molecular do gene *LPL*, dos genes que codificam para as apolipoproteínas apo A-IV, apo A-V, apo C-II e apo C-III e do *USF1*.

Entre Janeiro e Setembro de 2008 foram analisados 20 casos índice e 10 familiares. Os 10 exões e promotor da *LPL*, todos os exões codificantes das apolipoproteínas e as regiões contendo os dois polimorfismos do *USF1* associados à FCHL foram amplificados por PCR e submetidos a sequenciação directa. O estudo de grandes rearranjos no gene *LPL* foi efectuado por MLPA.

Dos 20 casos estudados, 7 (35%) não apresentaram alterações em nenhum dos genes em estudo, 6 (30%) apresentaram alterações no gene *LPL*, 1 (5%) apresentou alteração no gene *APOA-IV*, 6 (30%) apresentaram alterações no gene *APOA-V* e 11 (55%) apresentaram alterações no gene *USF1*. Não foram identificadas alterações nos genes *APOC-II* e *APOC-III*.

A identificação de alterações genéticas responsáveis pela hipertrigliceridemia permite a correcta identificação da patologia e a detecção precoce dos familiares afectados, permitindo uma melhor orientação terapêutica, com a subsequente redução no risco de doenças cardiovasculares prematuras.

**Palavras-chave** – Lipase Lipoproteica; Dislipidemia; Hipertrigliceridemia; Doença Cardiovascular.

## Abstract

Lipoprotein Lipase (LPL) has a key role in triglycerides metabolism, because is responsible for its hydrolysis into fatty acids and glycerol. Some variations in *LPL* gene have been found in patients with Familial LPL Deficiency (FLLD) and Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL), some leading to a total loss of LPL functionality and other giving only a parcial loss. Patients affected by these dyslipidemias generally have hypertriglyceridemia, which several studies have shown to be an independent risk factor for cardiovascular disease and is also associated with recurrent attacks of acute pancreatitis. Some apolipoproteins have been related with serum triglycerides levels and *USF1* (*Upstream Transcription Factor 1*) gene seems to be involved in FCHL.

The purpose of this study is the identification of genetic alterations responsible for hypertriglyceridemia in patients with FLLD phenotype and patients with suggestive FCHL phenotype through the molecular study of the *LPL* gene, apolipoproteins genes ( *APOA-IV*, *APOA-V*, *APOC-II*, *APOC-III*) and *USF1* gene.

Between January and September of 2008, a genetic analysis was performed in 20 index patients and 10 family members. All 10 exons and promotor of *LPL* gene, all coding exons of apolipoproteins genes and *USF1* regions containing the two polymorphisms associated with FCHL were amplified by PCR followed by direct sequencing. The study of large rearrangements in *LPL* gene was done by MLPA.

Of the 20 studied cases, 7 (35%) showed no sequence alteration in any genes under study, 6 (30%) showed different alterations in *LPL* gene, 1 (5%) showed one alteration in *APOA-IV* gene, 6 (30%) showed different alterations in *APOA-V* gene and 11 (55%) showed one or two of the the described polymorphisms in *USF1* gene. There were no sequence alterations in *APOC-II* and *APOC-III* genes.

Identification of genetic alterations responsible for hypertriglyceridemia allows the correct identification of pathology and early detection of affected family members, enabling a better choice of a therapeutic measure, with a subsequent reduction in the risk of premature cardiovascular disease.

**Keywords** - Lipoprotein Lipase; Dyslipidemia; Hypertriglyceridemia; Cardiovascular Disease.

# Índice

Agradecimentos.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Índice de tabelas e figuras.....	6
Abreviaturas.....	7
1 Introdução.....	8
1.1 Hipertrigliceridemia e Doenças Cardiovasculares.....	8
1.2 Metabolismo das Lipoproteínas.....	9
1.2.1 Lipoproteínas.....	9
1.2.2 Apolipoproteínas.....	9
1.2.3 Vias do metabolismo das lipoproteínas ricas em trigliceridos.....	11
1.3 Lipase Lipoproteica.....	13
1.3.1 O Gene.....	14
1.3.2 A Proteína.....	14
1.4 Patologias caracterizadas por hipertrigliceridemia.....	14
1.4.1 Deficiência Familiar em LPL (FLLD).....	14
1.4.2 Dislipidemia Familiar Combinada (FCHL).....	15
1.5 Outros genes que influenciam os níveis de trigliceridos no plasma.....	16
1.5.1 Gene <i>APOC-II</i> .....	16
1.5.2 Gene <i>APOC-III</i> .....	16
1.5.3 Gene <i>APOA-IV</i> .....	17
1.5.4 Gene <i>APOA-V</i> .....	17
1.5.5 Gene <i>USF1</i> .....	17
1.6 Outras causas de hipertrigliceridemia.....	18
1.7 Tratamento de hipertrigliceridemias.....	18
1.8 Objectivo do Estudo.....	18
2 Materiais e Métodos.....	20
2.1 Recrutamento dos doentes.....	20
2.2 Determinações Bioquímicas.....	20
2.3 Técnicas de Biologia Molecular.....	20
2.3.1 Extracção de DNA.....	20
2.3.2 Amplificação do DNA genómico dos genes em estudo.....	21
2.3.3 Visualização dos fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose.....	22
2.3.4 Purificação dos produtos de PCR.....	22

2.3.5 Sequenciação dos produtos de PCR.....	22
2.3.6 Análise de grandes rearranjos no gene da LPL por MLPA.....	23
3 Resultados.....	25
3.1 Caracterização Clínica.....	25
3.2 Análise Molecular.....	25
3.2.1 Gene <i>LPL</i> .....	27
3.2.2 Gene <i>APOA-IV</i> .....	28
3.2.3 Gene <i>APOA-V</i> .....	28
3.2.4 Genes <i>APOC-II</i> e <i>APOC-III</i> .....	28
3.2.5 Gene <i>USF1</i> .....	28
3.2.6 MLPA.....	28
4 Discussão.....	32
4.1 Dislipidemias Genéticas.....	32
4.2 Relação entre as patologias e as alterações encontradas.....	33
4.2.1 Deficiência Familiar em LPL.....	33
4.2.2 Dislipidemia Familiar Combinada.....	33
4.2.3 Outras Patologias.....	35
4.3 Casos Índice e alterações encontradas nos genes em estudo.....	35
4.3.1 Casos índice 99004 e 26035.....	35
4.3.2 Caso índice 20014.....	36
4.3.3 Casos índice 20071 e 26056.....	37
4.3.4 Caso índice 26003.....	37
4.3.5 Caso índice 26009.....	38
4.3.6 Caso índice 26068.....	40
4.3.7 Caso índice 26086 e 28025.....	40
4.3.8 Caso índice 27026.....	41
4.3.9 Caso índice 28053.....	42
4.3.10 Caso índice 28268.....	42
4.4 Doentes sem alterações em nenhum dos genes estudados.....	44
4.5 Medição da actividade da LPL e quantificação de apolipoproteínas.....	45
4.6 Tratamento estatístico dos resultados obtidos.....	45
5 Bibliografia.....	47
Anexo A.....	A1
Anexo B.....	B1

## Índice de Tabelas e Figuras

Tabela 1.1 - Propriedades das Lipoproteínas Humanas.....	10
Tabela 3.1 - Distribuição dos casos índice em dois grupos, grupo pediátrico e grupo dos adultos: Características clínicas e factores de risco para a doença cardiovascular.....	25
Tabela 3.2 - Caracterização clínica e história familiar dos casos índice.....	26
Tabela 3.3 - Análise molecular dos casos índice.....	29
Tabela 3.4 - Análise molecular do gene USF1 nos casos índice em estudo.....	29
Figura 1.1 - Estrutura geral de uma lipoproteína humana.....	10
Figura 1.2 - Esquema simplificado do metabolismo das lipoproteínas ricas em trigliceridos.....	13
Figura 3.1 - Caso índice 27026.....	30
Figura 3.2 - Caso índice 26009.....	31



## Abreviaturas

<b>Apo</b>	Apolipoproteína
<b>CT</b>	Colesterol Total
<b>DCV</b>	Doença Cardiovascular
<b>dL</b>	decilitro
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> )
<b>FCHL</b>	Dislipidemia Familiar Combinada ( <i>Familial Combined Hyperlipidemia</i> )
<b>FH</b>	Hipercolesterolemia Familiar ( <i>Familial Hypercholesterolemia</i> )
<b>FLLD</b>	Deficiência Familiar em LPL ( <i>Familial Lipoprotein Lipase Deficiency</i> )
<b>g</b>	Força centrífuga relativa
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade ( <i>High Density Lipoprotein</i> )
<b>IDL</b>	Lipoproteína de densidade intermédia ( <i>Intermediate Density Lipoprotein</i> )
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
<b>LDLR</b>	Receptor das lipoproteínas de baixa densidade ( <i>LDL Receptor</i> )
<b>Lp(a)</b>	Lipoproteína a
<b>LPL</b>	Lipase Lipoproteica
<b>m<sup>2</sup></b>	metro quadrado
<b>mg</b>	miligrama
<b>ml</b>	mililitro
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
<b>mM</b>	milimolar
<b>PCR</b>	Reacção de Polimerase em Cadeia ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>PCSK9</b>	<i>Protein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9</i>
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>TGs</b>	Trigliceridos
<b>U</b>	Unidade de actividade de enzima
<b>USF</b>	Upstream Transcription Factor
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade ( <i>Very Low Density Lipoprotein</i> )
<b>µl</b>	Microlitro
<b>°C</b>	Grau Celsius

# 1. Introdução

## 1.1 Hipertrigliceridemia e Doenças Cardiovasculares

A aterosclerose está na base das doenças cardiovasculares que constituem a principal causa de mortalidade e custos em saúde na população portuguesa, apesar dos enormes progressos terapêuticos e de diagnóstico que têm ocorrido nas últimas décadas <sup>[1]</sup>. Elevados níveis de triglicerídeos (TGs) no plasma estão associados a pelo menos três condições patogénicas que aceleram a aterosclerose: diminuição dos níveis de HDL (*high density lipoproteins*) plasmáticas, aumento das lipoproteínas remanescentes em circulação e pequena elevação dos níveis de LDL (*low density lipoproteins*) <sup>[2]</sup>. O nível elevado de triglicerídeos é reconhecido como marcador de condições clínicas e metabólicas como dislipidemia, resistência à insulina, hiperinsulinemia, diabetes e obesidade, todas elas associadas a um risco aumentado de aterosclerose e doenças cardiovasculares prematuras <sup>[3,4]</sup>.

A aterosclerose é uma doença comum, resultante de um processo inflamatório causado pela acumulação progressiva de deposições lipídicas e fibrosas na parede dos vasos arteriais <sup>[5]</sup>. Esta patologia é causada maioritariamente pela existência de níveis elevados de lipoproteínas aterogénicas <sup>[6]</sup> e caracteriza-se pela presença de disfunção endotelial, libertação local de citocinas, proliferação e migração de células musculares vasculares lisas e calcificação da placa <sup>[7]</sup>, sendo a principal causa de morte em todo o mundo <sup>[8]</sup>.

A associação entre os TGs e a Doença Coronária foi primeiramente reportada em 1954 por Goffman e colegas <sup>[9]</sup>. Em 1959, Albrink e Mann observaram que indivíduos com Doença Coronária tinham valores mais altos de triglicerídeos do que os indivíduos controlo <sup>[10]</sup>. Pela pesquisa epidemiológica e clínica nos últimos anos, ficou claro que níveis elevados de TGs no plasma estão fortemente associados ao aumento do risco de Doença Coronária <sup>[4,3]</sup>, devido ao efeito aterogénico directo das lipoproteínas ricas em TGs, particularmente as VLDL (*very low density lipoproteins*) <sup>[2]</sup>. A Doença Coronária é uma doença multifactorial que depende de factores genéticos e ambientais <sup>[11]</sup>, existindo nesta patologia um estreitamento do calibre das artérias coronárias devido a formação de placas ateroscleróticas, o que provoca a redução do fluxo sanguíneo levando à isquemia do miocárdio e, se a oclusão da artéria for total, à necrose do miocárdio.

Segundo a tabela de referencia para hipertrigliceridemia desenvolvida pelo Consenso da Conferência do *Natinal Institute of Health* sobre hipertrigliceridemia, nos Estados Unidos, valores de 500 mg/dL são considerados anormalmente altos e devem ser avaliados e tratados e valores inferiores a 150 mg/dL devem, geralmente, ser aceites como normais. Valores entre 150 mg/dL e 500 mg/dL aumentam em duas vezes o risco de doenças cardiovasculares <sup>[2]</sup>. De acordo

com o PROCAM (*Prospective Cardiovascular Munster Studie*), o risco de doença cardiovascular aumenta à medida que os níveis de TGs também aumentam. A análise de milhares de doentes, seguidos ao longo de 10 anos, revelou que uma elevação de 89 mg/dL nos TGs aumenta o risco de doença cardiovascular independentemente dos níveis de c-HDL. Assim, a hipertrigliceridemia moderada é certamente um factor de risco independente para as doenças cardiovasculares <sup>[12]</sup>. Pode-se prevenir/reduzir o risco de aparecimento de doenças cardiovasculares devidas a hipertrigliceridemia identificando os indivíduos em risco e os seus familiares e determinando a causa da hipertrigliceridemia, se ambiental ou genética. O diagnóstico molecular de dislipidemias que originam hipertrigliceridemia, como a Deficiência Familiar em LPL e a Dislipidemia Familiar Combinada (patologia complexa na qual existe um aumento dos níveis de colesterol e/ou trigliceridos), não é actualmente desenvolvido em Portugal e não existem quaisquer estudos epidemiológicos para determinação da prevalência destas patologias no nosso país.

## **1.2 Metabolismo das lipoproteínas**

### **1.2.1 Lipoproteínas**

Os lípidos são substâncias não polares que necessitam de ser transportadas dos locais de origem – no intestino (origem exógena) e no fígado (origem endógena) – para os locais de armazenamento e utilização, através de proteínas de transporte, as lipoproteínas <sup>[2,16]</sup>. As lipoproteínas são partículas esféricas responsáveis pelo transporte, no sangue, dos TGs, colesterol e ésteres de colesterol. São constituídas por um núcleo de lípidos não polares (ésteres de colesterol e TGs), envolvidos por compostos relativamente polares (fosfolípidos, colesterol livre e proteínas) <sup>[17,18]</sup> (figura 1.1) e as suas densidades estão inversamente relacionadas com as suas dimensões <sup>[19]</sup>. Estas partículas são definidas pelo seu tamanho, densidade, composição apolipoproteica e concentração lipídica (tabela 1.1) <sup>[20]</sup>.

### **1.2.2 Apolipoproteínas**

O componente proteico das lipoproteínas é denominado de apolipoproteína (apo). Estas apolipoproteínas (apo A, apo B, apo C e apo E, entre outras) variam no tamanho e na composição química <sup>[16,17]</sup> e participam, com os fosfolípidos, colesterol, TGs e ésteres de colesterol, na formação de seis classes de lipoproteínas: quilomicras, VLDL (*very low density lipoproteins*), LDL (*low density lipoproteins*), IDL (*intermediate density lipoproteins*), HDL (*high density lipoproteins*) e Lp(a) <sup>[17,19]</sup>.

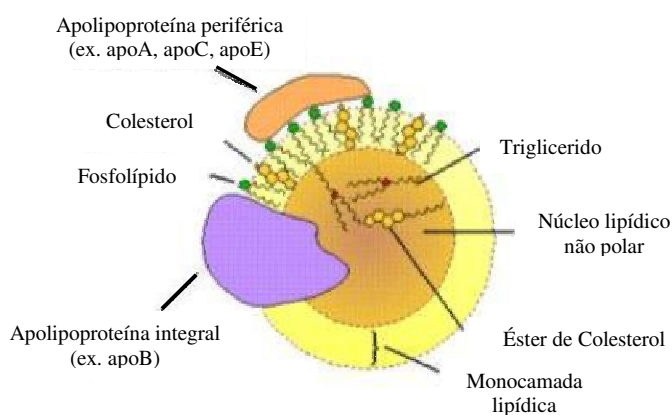
Cada classe de lipoproteínas possui uma variedade de apolipoproteínas em diferentes proporções, exceptuando as LDL que contêm apenas apo B-100 <sup>[20]</sup>. As apolipoproteínas têm,

colectivamente, três grandes funções fisiológicas: activação de enzimas importantes para o metabolismo das lipoproteínas; manter a integridade estrutural do complexo lipoproteico; e facilitar o reconhecimento das lipoproteínas por parte dos receptores específicos à superfície das células <sup>[18]</sup>.

**Tabela 1.1 - Propriedades das Lipoproteínas Humanas**

Classe	Quilomicras	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp(a)
	<0.95	0.9 -1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210	1.040-1.130
<b>Densidade (g/ml)</b>						
<b>Diâmetro (nanómetros)</b>	>70	25-70	22-24	19-23	4-10	25-30
<b>Peso Molecular (Daltons)</b>	0.4-30 x 10 <sup>9</sup>	5-10 x 10 <sup>6</sup>	3.9-4.8 x 10 <sup>6</sup>	2.75 x 10 <sup>6</sup>	1.8-3.6 x 10 <sup>5</sup>	2.9-3.7 x 10 <sup>6</sup>
<b>Principais Constituintes Lipídicos</b>	TGs exógenos	TGs endógenos	TGs e ésteres de colesterol endógenos	Ésteres de colesterol	Fosfolípidos	Ésteres de colesterol e fosfolípidos
<b>Principais Apolipoproteínas</b>	A-I A-IV A-V B-48 C-I C-II C-III	A-V B-100 C-I C-II C-III E	B-100 E	B-100	A-I A-II A-V	(a) B-100
<b>Fonte</b>	Intestino	Fígado	Catabolismo das VLDL e quilomicras	Catabolismo das VLDL	Fígado; Intestino; Catabolismo das quilomicras e VLDL	Fígado

VLDL, *Very Low Density Lipoproteins*; IDL, *Intermediate Density Lipoproteins*; LDL, *Low Density Lipoproteins*; HDL, *High Density Lipoproteins*; Lp(a), *Lipoprotein (a)*; TGs, Trigliceridos; ml, mililitro; g, grama; Da, Daltons. (Adaptado de Rifai *et al.* 1999 <sup>[20]</sup>)



**Figura 1.1** – Estrutura geral de uma lipoproteína humana.

(Adaptado de <http://www.icb.ufmg.br/prodabi/prodabi3/grupos/grupo3/colessinfig/transporte.gif>)

### 1.2.3 Vias do metabolismo das lipoproteínas ricas em trigliceridos

Os trigliceridos, tri-ésteres resultantes da combinação do glicerol com ácidos gordos, são principalmente utilizados pelos organismos vivos para fins de reserva alimentar e consequentemente como fonte de energia, constituindo a família mais abundante de lípidos <sup>[13]</sup>. Na generalidade, 40% ou mais da energia requerida diariamente pelos humanos nos países altamente industrializados é fornecida por uma dieta rica em trigliceridos <sup>[13]</sup>.

Uma dieta incorrecta, com consumo exagerado de gorduras e álcool, uma produção hepática de TGs aumentada ou uma diminuição do seu catabolismo devido principalmente a uma reduzida actividade das LPL <sup>[12]</sup> podem estar na origem de um aumento dos níveis séricos de TGs. Índices elevados destes lípidos promovem, para além do aumento do risco de doenças cardiovasculares, episódios recorrentes de pancreatite. Existem doentes de maior risco como é o caso dos doentes com diabetes <sup>[14]</sup> A diminuição, ausência ou deficiência de insulina provoca um aumento da lipólise intracelular e diminuição da actividade da LPL no endotélio dos capilares <sup>[15]</sup>. O aumento da lipólise dos TGs armazenados nos adipócitos provoca um aumento, no sangue, de ácidos gordos livres. Uma das consequências do aumento da concentração plasmática de ácidos gordos livres é o aumento da sua captação pelo fígado que os utiliza para sintetizar VLDL. Quer o aumento da síntese de VLDL hepática quer a diminuição da hidrólise dos TGs das VLDL (diminuição da actividade da LPL) explicam que na diabetes haja aumento das VLDL no plasma. Por outro lado, este aumento das VLDL vai provocar um aumento da velocidade de troca entre os TGs das VLDL e os ésteres de colesterol das HDL, diminuindo o colesterol associado às HDL. É ainda de salientar que o aumento de ácidos gordos livres leva à diminuição da degradação hepática de insulina contribuindo para a hiperinsulinemia e resistência à insulina..

São duas as vias através das quais as lipoproteínas ricas em trigliceridos são metabolizadas:

#### a) Via exógena

As quilomicras formam-se nos enterócitos, a partir dos TGs e colesterol ingeridos na dieta, e são transportados para vesículas secretórias no complexo de Golgi. Estas partículas são então transportadas por exocitose para o espaço extracelular e introduzidas na circulação através das vilosidades intestinais <sup>[20]</sup>.

O conteúdo lipídico das quilomicras recém formadas consiste essencialmente em TGs e o conteúdo proteico em apo B-48 e apo A <sup>[21]</sup>. Rapidamente após a sua entrada na circulação, estas partículas adquirem apolipoproteínas C e E das HDL circulantes <sup>[22]</sup>. A Apo C-II, agora

presente à superfície das quilomicras, activa as LPL ligadas à superfície luminal das células endoteliais, que rapidamente hidrolisam os TGs em ácidos gordos livres e glicerol <sup>[23]</sup>. Os ácidos gordos livres podem associar-se à albumina, sendo utilizados pelas células musculares como fonte de energia ou armazenados nas células adiposas <sup>[22]</sup>. Simultaneamente, alguns dos fosfolípidos e apo A são transferidas das quilomicras para as HDL, dando origem a quilomicras remanescentes <sup>[20]</sup>.

Devido à presença da apo B-48 à superfície, as quilomicras remanescentes podem ser reconhecidas por receptores hepáticos específicos para estas moléculas <sup>[24]</sup> e internalizadas por endocitose, sendo os seus componentes hidrolisados nos lisosomas. O colesterol libertado pode formar ácidos biliares, ser incorporado em lipoproteínas recém formadas ou armazenado como éster de colesterol <sup>[20]</sup>.

### **b) Via endógena**

Os hepatócitos têm capacidade de sintetizar TGs a partir de carboidratos e ácidos gordos <sup>[18]</sup>. Esses TGs endógenos e colesterol, também endógeno, são acoplados em vesículas secretórias no complexo de Golgi, transportados por exocitose para o espaço extracelular e introduzidas na circulação sob forma de VLDL <sup>[20]</sup>. Estas partículas, ricas em TGs, contêm apo B-100, apo E e pequenas quantidades de apo C na sua superfície <sup>[21]</sup>. São transferidas posteriormente, das HDL circulantes para as VLDL, apolipoproteínas C adicionais <sup>[20]</sup>.

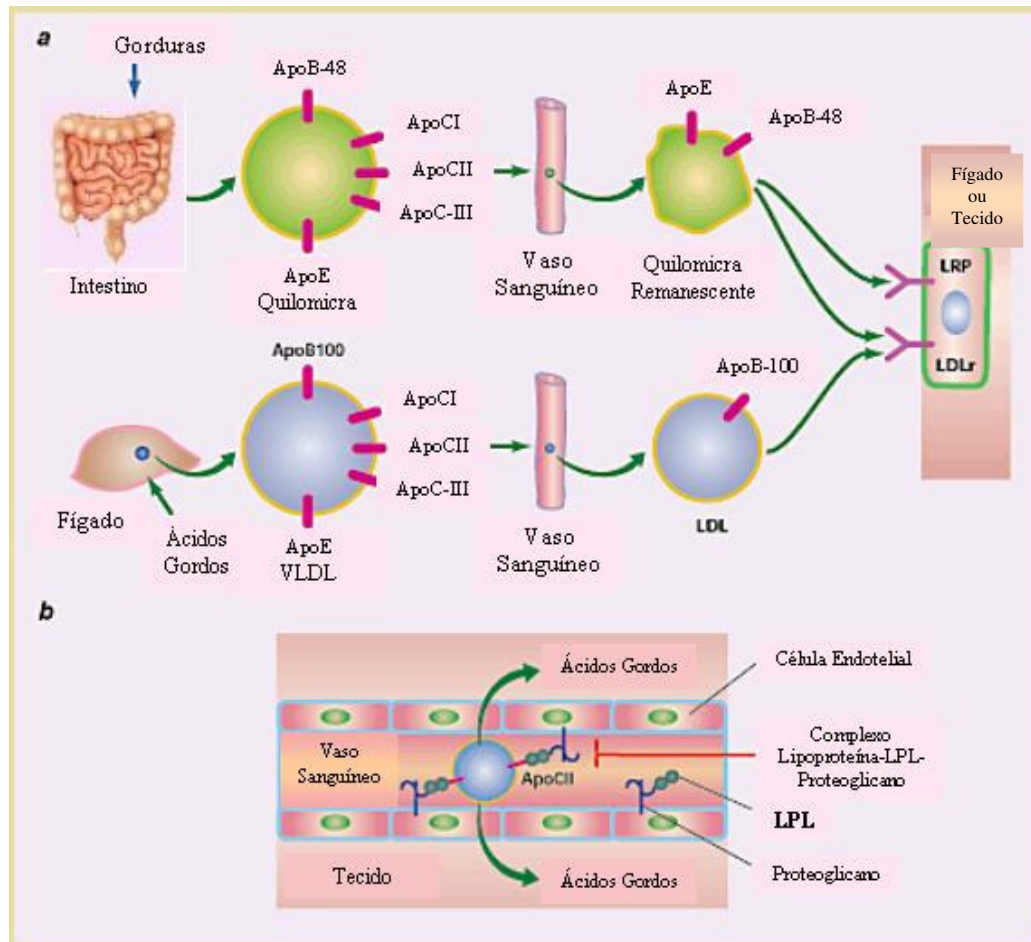
Tal como no metabolismo das quilomicras, as apo C-II presentes na superfície das VLDL, vão activar as LPL que fazem a hidrólise dos TGs com libertação de ácidos gordos <sup>[22]</sup>. Durante o processo de hidrólise dos TGs, as apolipoproteínas C são transferidas novamente para as HDL, transformando-se as VLDL em VLDL remanescentes. Algumas destas partículas são captadas por receptores celulares para o fígado e o resto é convertido em partículas mais pequenas e densas, as IDL <sup>[20]</sup>.

Cerca 50% das IDL, que também possuem inúmeras apolipoproteínas E, ligam-se a receptores hepáticos específicos e são removidas da circulação <sup>[21]</sup>. Os componentes da superfície destas partículas – alguns fosfolípidos, colesterol livre, e apolipoproteínas – são transferidos para as HDL circulantes ou formam HDL *de novo* <sup>[20]</sup>. As restantes IDL sofrem hidrólises sucessivas nas quais a maioria dos TGs ainda presentes são removidos e as apolipoproteínas, com excepção das apo B-100, são transferidas para outras lipoproteínas, transformando-se assim as IDL em LDL <sup>[21]</sup>. Estas lipoproteínas (LDL) contêm uma grande quantidade de colesterol e ésteres de colesterol que transportam até aos tecidos periféricos. As LDL em excesso no plasma são captadas por um receptor celular específico presente na superfície hepática – receptor das LDL – e são removidas da circulação. Níveis elevados de

LDL estão associados a ocorrência de aterosclerose e consequentemente de enfartes do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais.

### 1.3 Lipase Lipoproteica (LPL)

A LPL é uma enzima chave no metabolismo das lipoproteínas ricas em TGs. É sintetizada nas células parenquimais de tecidos extra-hepáticos como o tecido adiposo, músculo cardíaco e esquelético <sup>[25]</sup>, sendo translocada para o seu local fisiológico nos capilares <sup>[24]</sup>, onde



**Figura 1.2** – Esquema simplificado do metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídios. a) As quilomícras são sintetizadas no intestino, entram nos vasos sanguíneos onde ocorre a lipólise pela LPL e transformam-se em quilomícras remanescentes que são reconhecidas por receptores no fígado; as VLDL são sintetizadas pelo fígado, sofrem lipólises sucessivas pela LPL nos vasos sanguíneos e transformam-se em LDL que são reconhecidas pelos LDLr e são removidas da circulação; b) A apoC-II presente nas quilomícras e VLDL activa a LPL que está ligada aos proteoglicanos e ocorre a lipólise, com libertação de ácidos gordos. (Adaptado de <http://www.nature.com/nm/journal/v8/n2/images/nm0202-112-F1.gif>)

se liga ao sulfato de heparano das cadeias de proteoglicanos nas células endoteliais. Nesse local, a LPL pode actuar sobre as quilomícras e VLDL <sup>[26]</sup>. Uma característica única da LPL é a estimulação da sua actividade enzimática pela Apo C-II, o seu cofactor <sup>[27]</sup>. Assim, as lipoproteínas circulantes ricas em TGs proporcionam tanto o substrato como o activador específico para a reacção enzimática <sup>[15,28]</sup>.

### 1.3.1 O Gene

O gene da LPL humana encontra-se na região p22 do cromossoma 8, comportando aproximadamente 30 kilobases e 10 exões <sup>[25]</sup>. Este gene possui uma substancial homologia de sequência entre a maioria das espécies que foram estudadas <sup>[29]</sup>. Parte do exão 1 do gene *LPL* codifica para a 5'-UTR e péptido sinal. Os dois últimos codões do exão 1 juntamente com os exões 2, 3, 4, 5 e 6 codificam para o domínio N-terminal da proteína madura que inclui a região de ligação a lípidos, o centro activo e um local de ligação ao sulfato de heparano. Os exões 8 e 9 codificam para o domínio C-terminal da proteína madura que engloba um outro local de ligação ao sulfato de heparano. O exão 10 codifica para a 3'-UTR <sup>[15]</sup>. O local de ligação ao cofactor apo C-II não é conhecido. Aproximadamente 200 mutações (na sua maioria *missense*) conferindo uma extensa heterogeneidade molecular já foram reportadas <sup>[30]</sup>, sendo que, em homozigotia, algumas levam a uma deficiência total da LPL e em heterozigotia contribuem para a elevada predisposição para hipertrigliceridemia ou apenas para uma deficiência parcial da enzima <sup>[31]</sup>. A maioria das alterações neste gene está concentrada nos exões 4, 5 e 6 <sup>[32,33]</sup>.

### 1.3.2 A Proteína

O gene da LPL humana codifica para uma proteína de 475 aminoácidos, incluindo um péptido sinal de 27 aminoácidos <sup>[29]</sup>. A proteína LPL humana madura contém 448 aminoácidos, possui uma massa molecular de 50,394 Daltons e a sua sequência de aminoácidos apresenta 90% de homologia com a de outras espécies como o rato, vaca e o porco-da-Índia <sup>[15]</sup>. O centro activo é formado por três aminoácidos – Ser<sup>132</sup>, Asp<sup>156</sup> e His<sup>241</sup> e encontra-se activa sob forma de homodímero <sup>[29]</sup>. De acordo com modelos de homologia baseados na estrutura cristalográfica da lipase pancreática humana, a LPL possui um amplo domínio N-terminal (aminoácidos 1 a 312) e um curto domínio C-terminal (aminoácidos 313 a 418) <sup>[24]</sup>. Foram identificados na LPL humana 6 domínios funcionais: (i) o péptido sinal de 27 aminoácidos que é clivado da proteína; (ii) o centro activo; (iii) o local de interacção com o cofactor Apo C-II; (iv) o local de ligação a lípidos e lipoproteínas; (v) o local de interacção com o sulfato de heparano dos proteoglicanos; e (vi) o local para interacções não covalentes subunidade-subunidade <sup>[15,25]</sup>.

## 1.4 Patologias caracterizadas por hipertrigliceridemia

### 1.4.1 Deficiência Familiar em LPL (FLLD)

A Deficiência Familiar em LPL (FLLD) é uma patologia autossómica recessiva, sendo escassa a sua prevalência (1 caso em 1 milhão) <sup>[33]</sup> e a consanguinidade é comum nas famílias



afectadas. Os indivíduos com esta doença não possuem ou possuem muito pouca actividade da LPL. Para além disso, existe também uma redução acentuada das HDL e um aumento ligeiro das VLDL <sup>[34]</sup>.

A dislipidemia apresenta-se geralmente na infância com episódios de dor abdominal e soro anormalmente lipémico com formação, em certos casos, de uma camada leitosa sobrenadante <sup>[35]</sup>. Os doentes têm hiperquilomicronemia e hipertrigliceridemia severas (TGs>1000 mg/dL) devido a uma hidrólise defectiva por parte da LPL <sup>[33]</sup>. Outras manifestações clínicas incluem a presença de xantomas eruptivos, lipemia retinal, hepatosplenomegalia, devido à acumulação de quilomicras, e episódios recorrentes de pancreatite <sup>[12]</sup> que podem conduzir a uma insuficiência pancreática crónica <sup>[36]</sup>. O diagnóstico de FLLD baseia-se na medição da actividade enzimática da LPL no plasma após administração intravenosa de heparina e no estudo molecular do gene. Esta desordem tem sido descrita em todas as raças, tendo uma prevalência muito superior em algumas zonas do Quebec, no Canadá <sup>[35]</sup>. Apesar dos heterozigóticos para mutações no gene *LPL* só possuírem um dos dois alelos afectado, a actividade normal da enzima encontra-se reduzida a 50%, o que pode não ser necessário para manter concentrações normais de trigliceridos no plasma, conduzindo também a hipertrigliceridemia <sup>[29]</sup>.

Quando existe uma gravidez em que ambos os progenitores possuem alterações no gene *LPL*, o diagnóstico pré-natal é possível através da análise do DNA extraído de células fetais obtidas por amniocentese <sup>[35]</sup>. Este tipo de diagnóstico não é muito comum e não se realiza no nosso país.

#### **1.4.2 Dislipidemia Familiar Combinada (FCHL)**

A FCHL é uma patologia metabólica comum caracterizada por: (i) níveis aumentados de colesterol e/ou TGs em pelo menos dois membros da mesma família, (ii) variedade intra-individual e intra-familiar do fenótipo lípidico (iii) prevalência elevada de VLDL e/ou LDL, principalmente relacionados com um aumento da Apo B (> 120 mg/dL) e (iv) risco aumentado para DCV prematura <sup>[37]</sup>. Esta patologia foi primeiramente descrita, em 1973, por Goldstein e colaboradores <sup>[38]</sup>. No presente, a FCHL é a dislipidemia hereditária mais comum nos humanos, afectando 1-3% da população <sup>[39,40]</sup>. É uma doença poligénica, ou seja, causada por diferentes genes, originando igualmente diferentes manifestações clínicas e afecta de forma igual homens e mulheres, sendo autossómica dominante <sup>[30]</sup>.

Um estudo de Nevin e colaboradores <sup>[41]</sup> sobre a actividade da LPL em doentes com FCHL evidenciou que 36% desses doentes tinham valores diminuídos de actividade desta enzima. Outros estudos demonstraram que alterações na LPL afectam significativamente a

expressão do fenótipo lipídico e lipoproteico na FCHL<sup>[39]</sup>. Nos doentes com FCHL, a parede dos vasos sanguíneos está exposta a um maior número de partículas LDL pequenas e densas, que são muito aterogénicas. Também pode ocorrer uma activação não controlada de leucócitos pelas partículas aterogénicas que resulta numa activação de células endoteliais conduzindo ao aumento da aderência de células pró-inflamatórias ao endotélio, com danos para a barreira epitelial causados por stress oxidativo e citocinas<sup>[42]</sup>. Como não foi identificado ainda um gene principal causador desta patologia, vários genes, para além do gene *LPL*, têm sido apontados como causadores ou modeladores desta doença. Entre estes genes encontram-se o gene *USF1* (*Upstream Transcription Factor 1*), *APOA-IV*, *APOA-V* e *APOC-III*<sup>[43]</sup>.

## **1.5 Outros genes que influenciam os níveis de trigliceridos no plasma**

### **1.5.1 Gene *APOC-II***

O gene da apolipoproteína C-II localiza-se no cromossoma 19 (19q13) e possui 4 exões, sendo que apenas 3 são traduzidos<sup>[44]</sup>. A apo C-II é sintetizada como uma proteína precursora de 101 aminoácidos (pré-apo C-II), contendo um peptido sinal de 22 aminoácidos que é clivado para formar uma proteína madura de 79 aminoácidos<sup>[45]</sup>. O fragmento terminal da apo C-II, contendo os resíduos 44-79, representa o local de ligação à LPL promovendo a sua activação<sup>[46]</sup>. A importância fisiológica da apo C-II na activação da LPL foi estabelecida após terem sido encontrados doentes com Deficiência em Apo-CII que possuíam deficiências funcionais na LPL. Estes indivíduos possuem hipertrigliceridemia severa e têm dificuldades na eliminação das VLDL e quilomicras<sup>[47]</sup>.

### **1.5.2 Gene *APOC-III***

O gene da apolipoproteína C-III localiza-se no cromossoma 11 (11q23), juntamente com os genes *APOA-I*, *APOA-IV* e *APOA-V*<sup>[48]</sup>. A apo C-III é uma glicoproteína de 79 aminoácidos<sup>[49]</sup>, sintetizada predominantemente no fígado e em menor quantidade no intestino, presente nas VLDL e quilomicras<sup>[50]</sup>. Apesar da função precisa da apo C-III não estar claramente esclarecida, existem evidências que sugerem o seu envolvimento na regulação dos níveis de TGs. Esta apolipoproteína, *in vitro*, inibe a LPL e a Lipase Hepática resultando daí um atraso no catabolismo das partículas ricas em TGs<sup>[51]</sup>. Estudos *in vivo* demonstraram que a LPL de doentes com deficiência em apo C-III não é inibida, ao passo que soros contendo esta apolipoproteína em grandes quantidades possuíam uma actividade reduzida da enzima, o que suporta a ideia de que a apo C-III é um inibidor da LPL<sup>[52]</sup>.

### 1.5.3 Gene *APOA-IV*

O gene da apolipoproteína A-IV localiza-se no cromossoma 11, juntamente com os genes *APOA-I*, *APOA-V* e *APOC-III*, sendo constituído por três exões e dois intrões <sup>[53]</sup>. A apo A-IV é sintetizada principalmente no intestino e está presente nas quilomicras <sup>[54]</sup>. A proteína precursora possui 396 aminoácidos (pré-apo A-IV), contendo um peptido sinal de 20 aminoácidos que é clivado para formar uma proteína madura de 376 aminoácidos <sup>[55]</sup>. Goldberg et al (1990) <sup>[56]</sup> demonstrou que a apo A-IV aumenta a activação da LPL na presença do cofactor apo C-II. Este estudo sugere que a apo A-IV pode actuar como um modelador da activação da LPL. Para além disso esta apolipoproteína está também envolvida no metabolismo do colesterol, sendo importante para a activação da LCAT (Lecithin-Cholesterol AcylTransferase), envolvida no transporte reverso do colesterol <sup>[54]</sup>.

### 1.5.4 Gene *APOA-V*

O gene da apolipoproteína A-V faz parte do *cluster*, no cromossoma 11, que contém os genes da apo A-I, apo A-IV e apo C-III <sup>[57]</sup>. A apo A-V é uma proteína de 343 aminoácidos <sup>[58]</sup>, sintetizada exclusivamente no fígado e está presente nas VLDL, quilomicras e HDL <sup>[59]</sup>. Algumas alterações no gene da apo A-V têm sido associadas com alterações nos níveis de TGs, FCHL e aumento do risco de doenças cardiovasculares. Diversos estudos demonstraram que a apo A-V acelera a hidrólise das lipoproteínas ricas em TGs, pela LPL, pois facilita a interacção da enzima com estas partículas, através de um processo ainda desconhecido <sup>[60,58]</sup>.

### 1.5.5 Gene *USF1*

O gene *USF1* localiza-se no cromossoma 1 (1q22-23) <sup>[61]</sup>. Este gene codifica um factor de transcrição que, como homodímero ou através de heterodimerização com o USF2, se liga a E-boxes (CACGTG) presentes na sequência promotora de muitos genes <sup>[62]</sup>, modulando a expressão de mais de 40 genes envolvidos no metabolismo da glucose e dos lípidos e no processo inflamatório <sup>[63]</sup>. Embora as bases metabólicas e genéticas da FCHL não tenham sido completamente identificadas, Pajukanta e colaboradores <sup>[64]</sup> verificaram que, em 60 famílias, a FCHL estava associada a diferentes haplotipos do gene *USF1* <sup>[64,65]</sup>. Foi identificada uma associação entre a FCHL e dois polimorfismos no gene *USF1* (USF1s1-rs3737787 e USF1s2 - rs2073658), com uma distância de 1239 pares de bases entre eles <sup>[66]</sup>.

## 1.6 Outras causas de hipertrigliceridemia

Para além de causas genéticas, como alterações nos genes envolvidos no metabolismo dos trigliceridos, existem outros factores que condicionam a manifestação de hipertrigliceridemia. A diabetes *mellitus* é uma das causas mais comuns de hipertrigliceridemia. Os doentes com diabetes Tipo 1 apresentam deficiência de insulina, necessária ao bom funcionamento da LPL, o que vai afectar negativamente a actividade desta enzima. Geralmente, também existe super produção de VLDLs pelo fígado destes doentes, que geralmente se encontram acima de peso, e um metabolismo incompleto dessas lipoproteínas, o que conduz a uma acumulação das mesmas e consequentemente hipertrigliceridemia. Alguns factores externos como a dieta, o tabaco, o álcool, a actividade física do indivíduo e alguns medicamentos, também podem influenciar os níveis de TGs em circulação <sup>[12]</sup> e como tal, a determinação da causa de hipertrigliceridemia pode tornar-se complexa e difícil.

## 1.7 Tratamento das hipertrigliceridemias

A primeira medida terapêutica nos doentes com hipertrigliceridemia é a mudança do estilo de vida, com particular ênfase na dieta e na prática de exercício físico de forma regular. Os fármacos com maior acção nos TGs são os fibratos e as estatinas, mas alternativas como os ácidos gordos ómega 3 devem ser considerados. Em doentes com FCHL as estatinas são o fármaco de primeira linha, já que o que está aumentado é o número de partículas com apoB na sua composição. Terapêuticas combinadas podem ser consideradas, mas obrigam a uma vigilância médica mais apertada, face ao risco aumentado de efeitos secundários <sup>[67]</sup>. Os fibratos estimulam a beta-oxidação dos ácidos gordos maioritariamente nos peroxisomas e em parte na mitocondria, reduzindo 30-50% os níveis de TGs e ácidos gordos no plasma <sup>[68,12]</sup>.

## 1.8 Objectivo do Estudo

O objectivo deste estudo foi identificar alterações genéticas responsáveis pela hipertrigliceridemia apresentada em 20 doentes com dislipidemia familiar. Estes doentes apresentavam diferentes fenótipos e deste modo estabelecerem-se algumas hipóteses de estudo:

a) doentes com fenótipo sugestivo de FLLD deveriam apresentar alterações funcionais no gene LPL ou no gene *APOC-II*.

b) doentes com fenótipo sugestivo de FCHL deveriam apresentar alterações funcionais no gene *LPL*, *APOA-V* e pelo menos um dos polimorfismos descritos para o gene *USF1*.

c) nos doentes com hipertrigliceridemia mas sem fenótipo sugestivo de nenhuma das patologias referidas anteriormente deveria ser encontrada uma possível causa do fenótipo apresentado recorrendo ao estudo dos genes *LPL*, *APOA-IV*, *APO-V*, *APOC-II*, *APOC-III* e *USF1*, genes estes de grande importância funcional no metabolismo lipídico.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Recrutamento dos Doentes**

Foram recrutados 20 doentes para este estudo, dos quais: 7 com suspeita clínica de FLLD, baseada na manifestação de hipertrigliceridemia severa; 9 com um fenótipo sugestivo de FCHL, apresentando valores de colesterol e TGs elevados e valores de apo B superiores a 120 mg/dL; e 4 com hipertrigliceridemia mas que não se enquadram nas duas patologias anteriores. Todos os doentes que apresentavam colesterol elevado já tinham sido rastreados para a Hipercolesterolemia Familiar (FH) no Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, tendo sido realizado o estudo molecular dos 3 genes responsáveis pela FH nos quais não foi encontrada nenhuma alteração.

Para cada doente/familiar foi colhido 10 mL de sangue (2x5 mL) num tubo EDTA para extracção de DNA e 4 mL de sangue (soro) num tubo seco para determinação de parâmetros bioquímicos. As amostras, quando colhidas fora do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), foram enviadas por correio devidamente acondicionadas e ao cuidado do Grupo de Investigação Cardiovascular da Unidade de Investigação do Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas. Juntamente com as amostras de sangue, o medico enviou a declaração de consentimento informado assinada pelo doente/familiar e o resultado de um questionário clínico com dados relevantes para o estudo (anexo A). Após a chegada das amostras, foi-lhes atribuído um código confidencial e foram processadas com a máxima brevidade.

### **2.2 Determinações Bioquímicas**

Os testes bioquímicos utilizados para quantificar o colesterol total, c-LDL, c-HDL, TGs, apo A-I, apo B e Lp(a) em cada doente/familiar, foram realizados no Laboratório de Química Clínica no INSA, utilizando um método colorimétrico enzimático, num Hitachi 911 (Roche), segundo as instruções do fabricante.

### **2.3 Técnicas de Biologia Molecular**

#### **2.3.1 Extracção de DNA**

A extracção de DNA dos doentes/familiars, a partir dos leucócitos, foi realizada com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.). Este *kit* baseia-se em três passos principais:

- Lise das hemácias com a solução de lise celular, seguido da lise dos leucócitos e dos seus núcleos com a solução de lise nuclear.
- Remoção das proteínas por precipitação com a solução de precipitação de proteínas.
- Precipitação do DNA com Isopropanol.

Para cada doente/familiar, colocou-se 9 mL de reagente *Cell Lysis Solution* num tubo falcon de 15 mL e perfez-se com sangue até 13/14 mL. O tubo foi invertido 3 a 4 vezes e colocado numa placa de agitação durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de ser centrifugado a 2000 g durante 10 minutos a 18°C (centrifuga 5810R, Eppendorf). Decantou-se o sobrenadante por inversão e dissolveu-se completamente o *pellet* no vortex. Juntou-se 3 mL de reagente *Nuclei Lysis Solution* ao tubo e inverteu-se até se sentir uma solução viscosa. Seguidamente, adicionou-se 1 mL de reagente *Protein Precipitation Solution* e misturou-se por inversão 4 vezes seguido de vortex durante 20 segundos. Centrifugou-se a mistura nas mesmas condições anteriores e com uma pipeta descartável pipetou-se o sobrenadante para um tubo falcon limpo. Juntou-se 3 mL de Isopropanol e inverteu-se o tubo, devagar, até se visualizarem as fibrilhas de DNA que foram removidas com uma ponta P1000 para um tubo *eppendorf* de fundo redondo com 1 mL de etanol a 70% e -20°C. Centrifugou-se a mistura, durante 5 minutos, a 2000 g (microcentrifuga 5415D, Eppendorf) e posteriormente decantou-se o sobrenadante por inversão e colocou-se mais 1 mL de etanol. Voltou a centrifugar-se a mistura durante 5 minutos a 2000 g e decantou-se o sobrenadante, deixando o tubo secar, invertido, durante 5-10 minutos. Após secagem do DNA, este foi re-hidratado em 200 µl de água estéril e colocou-se o tubo num *thermomixer* (Grant-bio, Alfagene) com agitação (400-450 rpm) e a temperatura ambiente até total dissolução do DNA (entre 12 a 24 horas). Guardou-se o tubo a 4°C.

### 2.3.2 Amplificação do DNA genómico dos genes em estudo

Foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), integralmente os genes *LPL*, *APOA-IV*, *APOA-V* e *APOC-II* e parcialmente o gene *APOC-III* – os 3 exões codificantes. Para o gene *USF1* foram amplificadas as regiões que contêm os dois polimorfismos associados à FCHL. Todos os exões do gene *LPL* e apolipoproteínas e as regiões do gene *USF1* foram amplificados utilizando *primers* apropriados, *forward* e *reverse* (tabelas B1-B6), desenhados com o programa Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu>).

Para a reacção de PCR utilizou-se 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Bioline), Tampão de reacção 10x NH4 (Bioline), 1.5 mM de Mg<sup>2+</sup> (Bioline), 10 picomol de

cada *primer* (Invitrogen), 1.25 U de *Biotaq DNA Polymerase* (Bioline), 100-200 nanogramas de DNA e água até perfazer um volume de 25 µl (tabela B7). A PCR foi realizada com um programa específico para cada região a amplificar, num *T3000 Thermocycler* (Biometra®). As condições gerais de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, 32-35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos seguidos de *annealing* a 54-59°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto, extensão final a 72°C durante 7 minutos e arrefecimento até 4°C (tabelas B8 e B9).

### **2.3.3 Visualização dos fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose**

O gel de agarose a 1.5% (peso/volume) foi preparado adicionando 1,5 gramas de Agarose (Bioline) a 100 ml de solução tampão Tris Bórico Etilenodiaminatetra-acético (Tampão 10xTBE, Invitrogen). A solução foi aquecida no microondas durante aproximadamente 1.5-2 minutos e adicionou-se 5 µl de Brometo de Etídio (Sigma). O gel arrefeceu 20-30 minutos a temperatura ambiente e foi transferido para a tina contendo tampão suficiente para cobrir todo o gel. Misturou-se 6 µl de produto de PCR com 3 µl de Azul de Bromofenol (solução de deposição) e depositou-se a mistura nos poços do gel. Correu-se o gel a uma voltagem de 90 volts durante 35-40 minutos. O gel foi fotografado num *Gel Doc 2000 System* (Biorad) com o *software Quantity One 4.3.0* (Biorad).

### **2.3.4 Purificação dos produtos de PCR**

Os produtos de PCR foram purificados, de forma a eliminar *primers* e dNTPs em excesso, antes de se proceder à sua sequenciação. Para isso, utilizou-se o produto comercial Exo-Sap-IT® (*asb Corporation*) que combina uma Endonuclease I e uma *Shrimp alkaline phosphatase*. A 2.5 µl de produto de PCR adicionou-se 1 µl de Exo-Sap-IT® e incubou-se a 37°C durante 15 minutos e posteriormente aqueceu-se a 80°C durante 15 minutos num *T3000 Thermocycler* (Biometra) ou num *TProfessional Basic Gradient* (Biometra) para desactivar a enzima (tabela B10).

### **2.3.5 Sequenciação dos produtos de PCR**

A reacção de sequenciação utiliza didesoxinucleotídeos terminadores (ddNTPs) marcados por fluorescência preparados de acordo com as instruções do *kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (versão 2, *Applied Biosystems*). Para a reacção de sequenciação adicionou-se 1 µl de produto de PCR purificado, 2 µl de *BigDye®*, 1 µl de *primer*



de sequenciação (20 µl de *primer* de PCR e água a perfazer 100 µl) (tabelas B1, B2, B3, B4, B5 e B6) e água até perfazer 10 µl (tabela B11). A mistura de sequenciação é então submetido a uma reacção de sequenciação num *T3000 Thermocycler* (Biometra®) com o seguinte programa: 96°C durante 30 segundos, 25 ciclos a 96°C durante 10 segundos seguidos de 54°C durante 5 segundos, 60°C durante 4 minutos e arrefecimento até 4°C (tabela B12).

A sequenciação directa dos produtos de PCR foi realizada na Unidade Laboratorial de Utilização Comum do INSA, num sequenciador *3100 Genetic Analyser* de 16 capilares (*Applied Biosystems*) utilizando o polímero POP6, como descrito pelo fabricante. Para a análise das sequências obtidas foi utilizado o programa *Sequence Scanner* (*Applied Biosystems*) ou o programa *BioEdit*, retirado da Internet no endereço: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>.

### **2.3.6 Análise de grandes rearranjos no gene da LPL por MLPA**

A técnica de MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) é um método simples para detecção de alterações no número de cópias de mais de 45 sequências específicas numa única reacção de PCR, utilizando um único par de *primers*.

No *kit* MLPA para a LPL (*SALSA MLPA Kit P218-B1 LPL*, MRC-Holland), a mistura de sondas contém sondas MLPA para 9 dos 10 exões deste gene, com produtos entre 154 e 310 nucleótidos. Adicionalmente, contém 7 fragmentos controlo gerando um produto de amplificação inferior a 120 nucleótidos (tabela B13). Para confirmação de deleções ou duplicações no gene deve ser feito um *Southern Blot* ou um *long PCR*.

#### **a) Desnaturação do DNA e hibridação das sondas MLPA**

1.5 µl de cada amostra de DNA (20-500 nanograma) foi diluída em 3.5 µl de TBE e aquecida num *TProfessional Basic Gradient* (Biometra) durante 5 minutos a 98°C, seguindo-se um arrefecimento até aos 25°C antes de se abrir o termociclador. Uma mistura de 1.5 µl de *SALSA Probemix* com 1.5 µl de *MLPA Buffer* foi adicionada a cada um dos tubos e homogeneizadas com cuidado. O tubo foi incubado a 95°C durante 1 minuto seguido de 16 horas a 60°C (tabela B14-1).

#### **b) Reacção de Ligação**

Após as 16 horas, reduziu-se a temperatura do termociclador para 54°C e adicionou-se 32 µl de uma *mix Ligase-65* preparada com 3 µl de *ligase-65 Buffer A*, 3 µl de *ligase-65 Buffer*

B, 25 µl de água e 1 µl de *Ligase-65* (tabela B14-2). Homogeneizou-se bem e incubou-se a 54°C durante 15 minutos, seguidos de 5 minutos a 98°C. A *Ligase-65 mix* foi preparada menos de uma hora antes da sua utilização.

### **c) Reacção de PCR**

Foram misturados em novos tubos *ependorf*: 4 µl de SALSA PCR *buffer*, 26 µl de água e 10 µl de produto da reacção de ligação MLPA. Os novos tubos foram colocados no termociclador a 60°C até estabilizarem. Mantendo a temperatura nos 60°C, foram adicionados a cada tubo 10 µl de uma *mix Polymerase*, preparada menos de uma hora antes da sua utilização, com 2 µl de SALSA PCR-*primers*, 2 µl de SALSA *Enzyme Dilution Buffer*, 5.5 µl de água e 0.5 µl de SALSA *Polymerase*. A reacção de PCR foi iniciada de imediato. As condições de PCR para a MLPA foram: 95°C durante 30 segundos, 35 ciclos de 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, 72°C durante 20 minutos e um arrefecimento até 4°C (tabela B14-3).

### **d) Analise da MLPA**

Os produtos de amplificação da MLPA foram analisados na Unidade Laboratorial de Utilização Comum do INSA, com recurso a um *GeneScan Analysis Software Version 3.1.3* e um *Genotyper Software Version 2.5 (Applied Biosystems)*, sendo os resultados disponibilizados em ficheiros Excel.

### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterização Clínica

Neste estudo foram analisados 20 indivíduos no total, dos quais 7 com suspeita clínica de FLLD, 10 com fenótipo sugestivo de FCHL e 3 com hipertrigliceridemia mas que não se enquadram nas duas patologias anteriores.

Os casos índice foram separados em dois grupos, o grupo pediátrico e o grupo dos adultos e foi feita uma comparação de parâmetros demográficos, características clínicas e factores de risco (tabela 3.1). As características clínicas e parâmetros bioquímicos determinados nestes indivíduos encontram-se descritos na tabela 3.2. Adicionalmente, foram estudados 10 familiares, dos quais apenas 4 apresentavam valores de triglicéridos acima do normal.

**Tabela 3.1 – Distribuição dos casos índice em dois grupos, grupo pediátrico e grupo dos adultos: características clínicas e factores de risco para a doença cardiovascular**

	Grupo Pediátrico	n	Grupo dos Adultos	n
Idade (anos)	6.6 ± 9.0	2	48.7 ± 10.5	18
Sexo Feminino (%)	50.0	2	33.3	18
Sexo Masculino (%)	50.0	2	66.7	18
DCV (%)	0.0	2	27.8	18
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	---	---	27.2 ± 2.8	14
Tiróide (%)	0.0	2	0.0	16
Diabetes (%)	0.0	2	12.5	16
Hipertensão (%)	0.0	2	37.5	16
Hábitos Tabágicos (%)	0.0	2	31.3	16
Consumo de Álcool (%)	0.0	2	37.5	16
Exercício Físico (%)	0.0	2	43.8	16
Medicação (%)	---	---	88.2	17

DCV, Doença Cardiovascular; IMC, Índice de Massa Corporal; n, número de indivíduos considerados.

#### 3.2 Análise Molecular

Após a caracterização clínica dos doentes em estudo, procedeu-se à análise molecular dos mesmos. Na tabela 3.3 e 3.4 encontram-se as alterações encontradas nos genes em estudo.

**Tabela 3.2 – Caracterização clínica e história familiar dos casos índice**

Caso Índice	Idade (anos)	Sexo	DCV	Caracterização Clínica								História Familiar		
				CT <sup>1</sup> (mg/dL)	c-LDL <sup>1</sup> (mg/dL)	c-HDL <sup>1</sup> (mg/dL)	TGs <sup>1</sup> (mg/dL)	CT <sup>2</sup> (mg/dL)	c-LDL <sup>2</sup> (mg/dL)	c-HDL <sup>2</sup> (mg/dL)	TGs <sup>2</sup> (mg/dL)	ApoB <sup>2</sup> (mg/dL)	HiperC	DCV
99004 <sup>b</sup>	66	F	S	339	---	---	254	---	---	---	---	191.5 <sup>*</sup>	S	S
20014 <sup>b</sup>	49	M	N	352	274	31	204	252 <sup>*</sup>	166 <sup>*</sup>	43 <sup>*</sup>	212 <sup>*</sup>	163.0 <sup>*</sup>	S	N
20060 <sup>b</sup>	54	M	S	340	263	50	319	268 <sup>*</sup>	162 <sup>*</sup>	56 <sup>*</sup>	253 <sup>*</sup>	137.0 <sup>*</sup>	S	S
20071 <sup>b</sup>	48	F	N	297	254	35	100	325 <sup>*</sup>	227 <sup>*</sup>	42 <sup>*</sup>	284 <sup>*</sup>	240.0 <sup>*</sup>	S	S
26003 <sup>c</sup>	41	F	N	343	---	59	763	200 <sup>*</sup>	71 <sup>*</sup>	67 <sup>*</sup>	312 <sup>*</sup>	100.3 <sup>*</sup>	S	N
26009 <sup>b</sup>	42	M	N	419	---	---	1095	232 <sup>*</sup>	134 <sup>*</sup>	38 <sup>*</sup>	300 <sup>*</sup>	133.4 <sup>*</sup>	S	N
26035 <sup>b</sup>	69	F	S	300	195	38	450	---	---	---	---	---	S	N
26046 <sup>c</sup>	47	M	N	303	222	31	616	183 <sup>*</sup>	---	43 <sup>*</sup>	610 <sup>*</sup>	70.0 <sup>*</sup>	S	N
26056 <sup>b</sup>	51	M	N	270	230	48	250	---	---	---	---	---	S	N
26068 <sup>c</sup>	58	M	S	301	175	43	413	172 <sup>*</sup>	82 <sup>*</sup>	42 <sup>*</sup>	241 <sup>*</sup>	79.5 <sup>*</sup>	S	N
26086 <sup>b</sup>	41	M	S	---	---	---	---	251 <sup>*</sup>	141 <sup>*</sup>	36 <sup>*</sup>	372 <sup>*</sup>	136.5 <sup>*</sup>	S	N
27026 <sup>b</sup>	58	M	N	292	199	46	265	186 <sup>*</sup>	96 <sup>*</sup>	46 <sup>*</sup>	220 <sup>*</sup>	84.0 <sup>*</sup>	S	S
27126 <sup>a</sup>	46	F	N	961	---	130	4639	855 <sup>*</sup>	---	61 <sup>*</sup>	4954 <sup>*</sup>	126.0 <sup>*</sup>	S	S
28025 <sup>a</sup>	38	M	N	---	---	---	---	433	---	46	2761	103.0	S	N
28051 <sup>b</sup>	44	M	N	300	---	---	400	---	---	---	---	---	S	S
28053 <sup>a</sup>	26	M	N	753	97	32	7801	---	---	---	---	---	S	N
28094 <sup>a</sup>	57	F	N	380	---	55	1084	364 <sup>*</sup>	237 <sup>*</sup>	47 <sup>*</sup>	452 <sup>*</sup>	133.0 <sup>*</sup>	S	S
28250 <sup>a</sup>	42	M	N	---	---	---	1051	---	---	---	280 <sup>*</sup>	---	N	S
28268 <sup>a</sup>	14	F	N	---	---	---	---	139	---	8	1156	30	N	N
28301 <sup>a</sup>	<1	M	N	---	---	---	---	310 <sup>*</sup>	---	---	1102 <sup>*</sup>	240 <sup>*</sup>	N	N

M, Masculino; F, Feminino; DCV, Doença Cardiovascular; S, Sim; N, Não; CT, Colesterol Total; c-LDL, Colesterol LDL; c-HDL, Colesterol HDL; TGs, Trigliceridos; ApoB, Apolipoproteína B; HiperC, Hipercolesterolemia; <sup>1</sup>, Valores antes de tratamento; <sup>2</sup>, Valores presentes determinados no estudo; \*, Valores presentes em tratamento; <sup>a</sup>, doentes com suspeita clínica de Deficiência Familiar em LPL; <sup>b</sup>, doentes com fenótipo sugestivo de FCHL; <sup>c</sup>, doentes com hipertrigliceridemia mas que não se inserem nas duas patologias anteriores.

Dos 20 casos estudados, 7 (35%) não apresentaram alterações em nenhum dos genes em estudo, 6 (30%) apresentaram alterações no gene *LPL*, 1 (5%) apresentou uma alteração no gene *APOA-IV*, 6 (30%) apresentaram alterações no gene *APOA-V* e 11 (55%) apresentaram alterações no gene *USF1*. Não foram identificadas alterações nos genes *APOC-II* e *APOC-III*. As alterações S447X no gene *LPL*, S19W no gene *APOA-V* e os polimorfismos USF1s1 e USF1s2 no gene *USF1* foram encontradas em mais do que um caso índice.

Dos 7 casos índice em que havia suspeita clínica de Deficiência Familiar em *LPL*, 3 possuíam alterações em alguns dos genes em estudo: um dos doentes apresentou alterações no gene *LPL* (G188E e S259G), 2 apresentaram alterações no gene *APOA-V* (S19W) e um apresentou alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2). Relativamente aos 10 casos índice com fenótipo sugestivo de FCHL, 8 possuíam alterações em alguns dos genes em estudo: quatro dos doentes apresentaram alterações no gene *LPL* (S447X), 3 apresentaram alterações no gene *APOA-V* (S19W e D332fsX336) e 7 apresentaram alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2). Já nos 3 casos índice com hipertrigliceridemia mas que não se enquadram nas duas patologias anteriores, 2 possuíam alterações em alguns dos genes em estudo: 1 dos doentes apresentaram alterações no gene *LPL* (N291S), 1 apresentou uma alteração no gene *APOA-IV* (Q360H) e 2 apresentaram alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2).

### 3.2.1 Gene *LPL*

Dos 20 casos índice estudados, seis (30 %) apresentaram alterações no gene *LPL*, uma das quais ainda não se encontra descrita (tabela 3.3). Estas alterações incluem duas mutações pontuais (G188E e S259G), dois polimorfismos relacionados com hipertrigliceridemia (N291S e S447X), em que o segundo causa o aparecimento de um codão stop prematuro resultando numa proteína truncada e uma alteração ainda não descrita - A433V (figura 3.1). As duas mutações encontradas e os dois polimorfismos já foram descritos anteriormente <sup>[71,72,73,74]</sup>. Todas as alterações foram encontradas em adultos, com excepção da G188E e S259G, que foram encontradas numa criança.

Num painel de 50 normolipidemicos foi encontrado o polimorfismo S447X com uma frequência de 18% e a alteração A433V com uma frequência de 2%. A média dos valores de TGs para este painel foi de 75.4±33.6 mg/dL e a média dos valores de TGs nos indivíduos onde foi encontrada a alteração S447X foi de 82.5±37.5 mg/dL.

### 3.2.2 Gene *APOA-IV*

Dos 20 casos índice estudados, um apresentou uma alteração no gene *APOA-IV* (tabela 3.3). Esta alteração corresponde a um polimorfismo, Q360H, já descrito anteriormente e relacionado com hipertrigliceridemia <sup>[53]</sup>.

### 3.2.3 Gene *APOA-V*

Dos 20 casos índice estudados, seis (30 %) apresentam alterações no gene *APOA-V*, uma das quais ainda não se encontra descrita (tabela 3.2). Estas alterações incluem um polimorfismo relacionado com hipertrigliceridemia (S19W) e um pequeno rearranjo (figura 3.2) caracterizado pela deleção de 4 bases (ACAG), duas no aminoácido da posição 332 e duas no aminoácido da posição 333, que causa alteração na grelha de leitura (*frameshift*) e aparecimento de codão stop prematuro na posição 336 (D332fsX336).

Ambas as alterações foram encontradas em adultos, sendo que o polimorfismo S19W foi encontrado em 5 dos 6 doentes com alterações neste gene e já se encontra descrito <sup>[75]</sup>, estando associado a hipertrigliceridemia. A mutação D332fsX336 ainda não se encontra descrita.

### 3.2.4 Genes *APOC-II* e *APOC-III*

O estudo molecular destes genes não revelou qualquer mutação em nenhum dos casos índice em estudo.

### 3.2.5 Gene *USF1*

Dos 20 doentes estudados, 11 (55%) apresentaram alterações no gene *USF1* que já se encontram descritas e estão associadas à FCHL <sup>[64]</sup>. Estas alterações incluem um polimorfismo no exão 11 (USF1s1) e um polimorfismo no intrão 7 (USF1s2) deste gene. Ambos os polimorfismos foram encontrados nos casos índice adultos.

### 3.2.6 MLPA

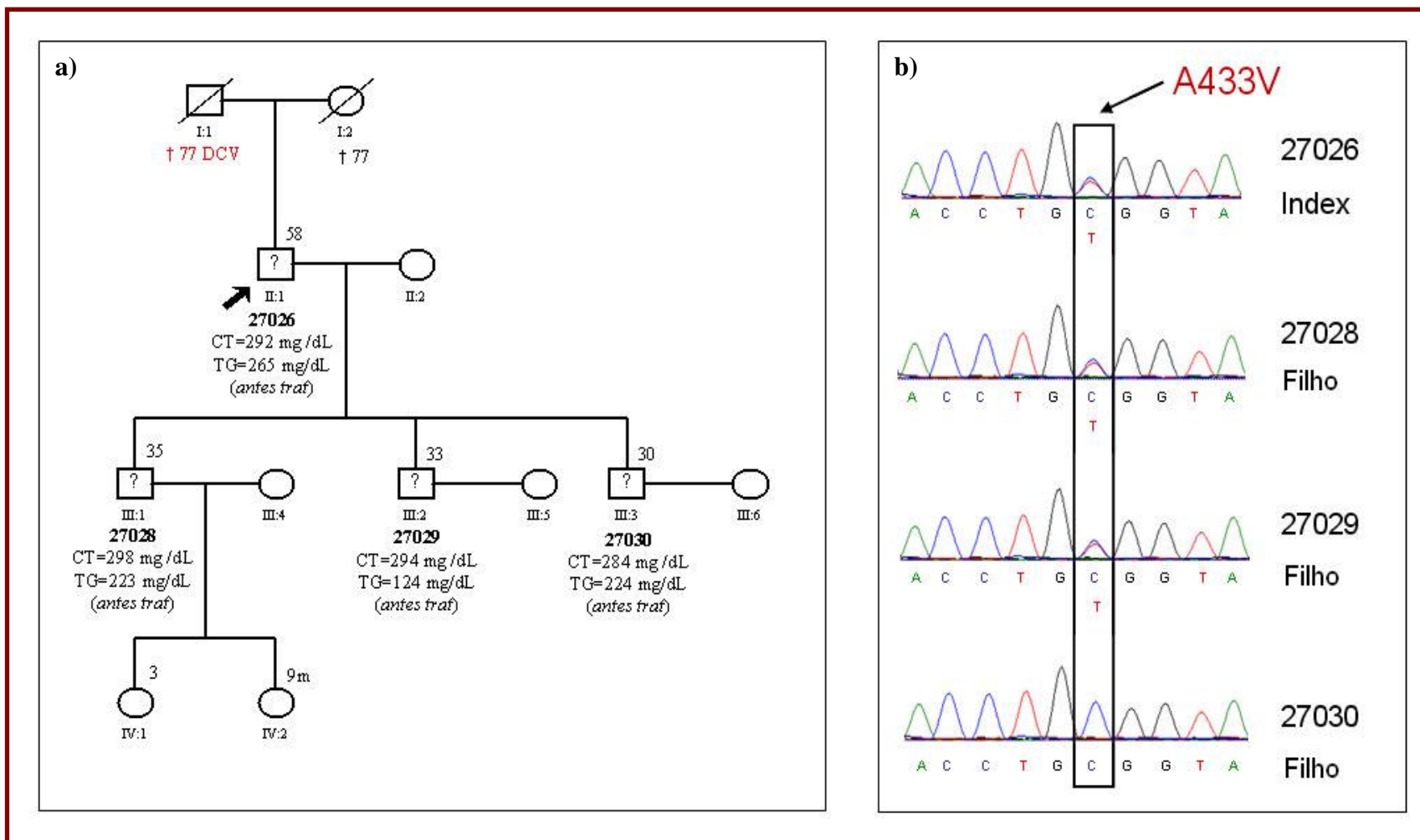
A técnica de MLPA não detectou quaisquer rearranjos (grandes deleções ou inserções) no gene *LPL* dos casos índice em estudo.

**Tabela 3.3 – Análise molecular dos casos índice**

Caso Índice	Gene <i>LPL</i>		Gene <i>APOA-IV</i>		Gene <i>APOA-V</i>	
	Alteração	Local	Alteração	Local	Alteração	Local
99004	S447X (c.1595 C>G)	Exão 9	---	---	---	---
20014	S447X (c.1595 C>G)	Exão 9	---	---	S19W (c.56 C>G)	Exão 2
20060	---	---	---	---	---	---
20071	---	---	---	---	---	---
26003	---	---	Q360H (c.1140 G>T)	Exão 3	---	---
26009	---	---	---	---	D332fsX336 (c.995_998delACAG)	Exão 3
26035	S447X (c.1595 C>G)	Exão 9	---	---	---	---
26046	---	---	---	---	---	---
26056	---	---	---	---	---	---
26068	N291S (c.1127 A>G)	Exão 6	---	---	---	---
26086	---	---	---	---	S19W (c.56 C>G)	Exão 2
27026	A433V (c.1553 C>T)	Exão 9	---	---	S19W (c.56 C>G)	Exão 2
27126	---	---	---	---	---	---
28025	---	---	---	---	S19W (c.56 C>G)	Exão 2
28051	---	---	---	---	---	---
28053	---	---	---	---	S19W (c.56 C>G)	Exão 2
28094	---	---	---	---	---	---
28250	---	---	---	---	---	---
28268	G188E (c.818 G>A)	Exão 5	---	---	---	---
	S259G (c.1030 A>G)	Exão 6	---	---	---	---
28301	---	---	---	---	---	---

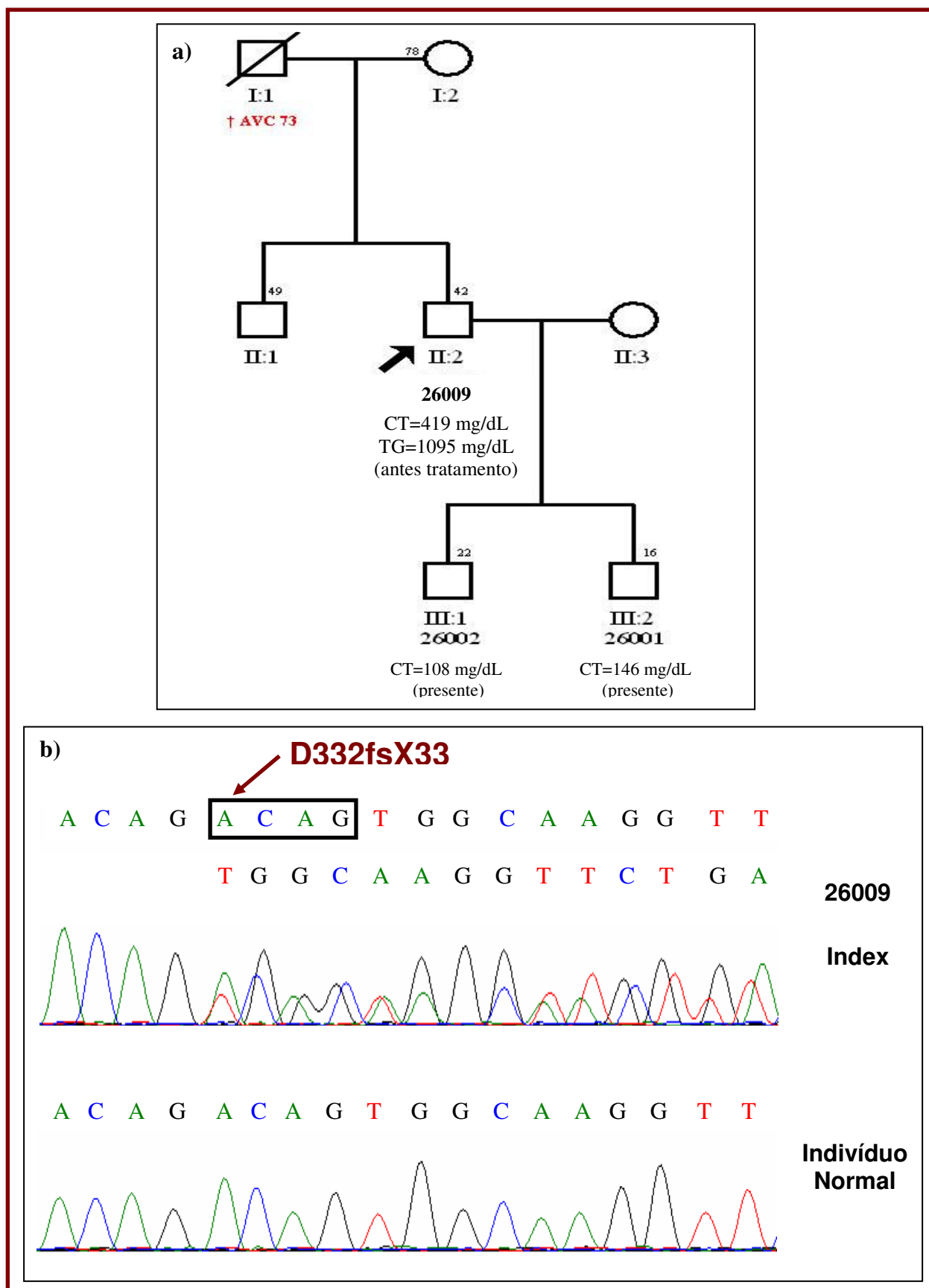
**Tabela 3.4 – Casos Índice com alterações no gene *USF1***

Caso Índice	Gene <i>USF1</i>	
	Alteração	Local
99004	USF1S1 C/T	Exão 11
	USF1S2 G/A	Intrão 7
20014	USF1S1 C/T	Exão 11
	USF1S2 G/A	Intrão 7
20071	USF1S1 C/T	Exão 11
26003	USF1S1 C/T	Exão 11
26009	USF1S1 C/T	Exão 11
	USF1S2 G/A	Intrão 7
26035	USF1S2 G/A	Intrão 7
26056	USF1S1 C/T	Exão 11
26068	USF1S1 C/T	Exão 11
27026	USF1S1 C/T	Exão 11
28053	USF1S1 C/T	Exão 11
	USF1S2 G/A	Intrão 7
28268	USF1S2 G/A	Intrão 7



**Figura 3.1** – Caso índice 27026. a) Árvore genealógica. A seta indica o caso índice. A idade em anos, os valores de CT e TGs e os eventos ocorridos (DCV, Doença Cardiovascular; †, morte) estão representados por baixo dos símbolos. b) Sequência de parte do exão 9 do gene *LPL* do caso index e familiares onde se observa a alteração C→T na posição 1553 (A433V).





**Figura 3.2** – Caso índice 26009. a) Árvore genealógica. A seta indica o caso índice. A idade em anos, os valores de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TGs) e os eventos ocorridos (AVC, Acidente Vascular Cerebral; †, morte) estão representados por baixo dos símbolos. b) Sequência de parte do exão 3 do gene *APOA-V* do caso índice onde se observa a deleção ACAG na posição c.995 (D332fsX336).

## 4. Discussão

### 4.1 Dislipidemias Genéticas

As dislipidemias genéticas são na sua maioria complexas, podendo ser originadas por alterações em um ou mais genes. Inúmeros factores para além dos genéticos podem modelar o fenótipo de um doente com dislipidemia, como certas doenças (diabetes e distúrbios da tiróide por exemplo), medicação, consumo de álcool, hábitos tabágicos, dieta, entre outros. Algumas dislipidemias genéticas como a Hipercolesterolemia Familiar (FH) têm sido amplamente estudadas em diversas populações, incluindo na nossa, tendo-se já estabelecido quais os genes responsáveis por esta dislipidemia. Em Portugal, o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar faz o diagnóstico molecular de doentes com suspeita de FH, analisando os genes *LDLR*, *PCSK9* e *APOB* <sup>[76]</sup>. Por outro lado, dislipidemias como a FLLD e a FCHL não estão tão vastamente exploradas na generalidade das populações, incluindo na população portuguesa.

Apesar da FLLD ser uma patologia recessiva que resulta de mutações no gene *LPL*, alterações em outros genes envolvidos no metabolismo dos TGs e que interagem com a LPL provocando diminuição da sua actividade enzimática podem resultar num fenótipo semelhante ao da FLLD. A Deficiência Familiar em apo C-II (cofactor da LPL) é um desses casos <sup>[46]</sup>. Esta dislipidemia resulta no mesmo fenótipo da FLLD, uma vez que não existindo cofactor a enzima LPL não é activada e não ocorre a lipólise. Assim, torna-se complicado diagnosticar correctamente a FLLD tendo em conta apenas o seu fenótipo, é necessário fazer a análise molecular do gene *LPL* e genes envolvidos no metabolismo dos TGs e que possam afectar a actividade da enzima, como os genes *APOC-II* (co-factor da LPL), *APOC-III* (inibidor da LPL), *APOA-IV* e *APOA-V* (modeladores da actividade da LPL).

A FCHL é uma dislipidemia ainda mais complexa, onde os membros das famílias afectadas apresentam diferentes perfis lipídicos, podendo haver casos em que os indivíduos possuem valores elevados de TGs e colesterol e casos em que apenas um destes parâmetros se encontra elevado. Assim, num doente com FCHL que só apresente valores elevados de colesterol, esses valores podem, por exemplo, ser facilmente interpretados como indicativos de FH e não FCHL. Além disso, não é possível fazer o diagnóstico molecular desta dislipidemia, uma vez que ainda não foi estabelecido um gene causador desta patologia. No momento só é possível estudar vários genes que se pensa estarem associados à FCHL, como é o caso do gene *APOA-V* e *USF1* (regulador de vários genes envolvidos no metabolismo lipídico). Entende-se portanto que há uma certa dificuldade na compreensão e diagnóstico da FCHL, tanto a nível clínico como genético.

Para além da sua complexidade, o estudo de alterações genéticas envolvidas nestas duas dislipidemias não está muito desenvolvido, sendo poucos os estudos funcionais realizados até à data. Há por isso, uma grande necessidade de clarificar estas patologias, sobretudo a FCHL. Com este estudo, o Grupo de Investigação Cardiovascular do Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas do INSA torna-se pioneiro no diagnóstico molecular da Deficiência Familiar em LPL, uma vez que é o único no país a fazer a análise molecular do gene *LPL*. Relativamente à FCHL, não existia em Portugal, até à data, estudos sobre esta dislipidemia, sendo este o primeiro. Assim, esta tese tem como principal objectivo o estudo molecular de doentes com dislipidemia familiar caracterizada por hipertrigliceridemia, de forma a identificar a sua causa genética. Para tal, além da análise molecular do gene *LPL* analisaram-se outros genes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas ricas em TGs e que interferem na actividade enzimática da LPL, como os genes *APOA-IV*, *APOA-V*, *APOC-II* e *APOC-III*. Para além destes genes estudaram-se dois polimorfismos do gene *USF1* e o gene *APOA-V*, que vários estudos apontam como estando envolvidos na FCHL <sup>[64,66,77]</sup>.

## **4.2 Relação entre as patologias e as alterações encontradas**

### **4.2.1 Deficiência Familiar em LPL**

Dos 7 casos índice em que havia suspeita clínica de FLLD, 3 possuíam alterações em alguns genes em estudo: o doente 28025 apresentou uma alteração no gene *APOA-V* (S19W) já descrita <sup>[75]</sup>; o doente 28053 apresentou uma alteração no gene *APOA-V* (S19W) e duas alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2) já descritas <sup>[66]</sup>; e a doente 28268 apresentou duas alterações no gene *LPL* (G188E e S259G) já descritas <sup>[71,72]</sup> e uma alteração no gene *USF1* (USF1s2). Sendo a FLLD uma doença recessiva resultante de mutações no gene *LPL*, só o caso índice 28268 sofre desta patologia. Os outros dois doentes apresentam a alteração S19W que se encontra associada ao aumento dos níveis séricos de TGs. A associação do polimorfismo S19W com o aumento dos níveis séricos de TGs e diminuição dos níveis de apo A-V foi demonstrado *in vivo* por Ahituv e colaboradores <sup>[78]</sup>. Os resultados obtidos permitem também inferir que os polimorfismos no gene *USF1*, para além de estarem associados à FCHL, também estão associados a hipertrigliceridemia resultante de outras patologias. Assim, foi encontrada uma possível causa da hipertrigliceridemia em 3 dos 7 doentes com suspeita clínica de FLLD.

### **4.2.2 Dislipidemia Familiar Combinada**

Relativamente aos 10 casos índice com fenótipo sugestivo de FCHL, 8 possuíam alterações em alguns dos genes em estudo: o doente 99004 apresentou uma alteração no gene

*LPL* (S447X), já descrita <sup>[74]</sup> e duas alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2); o doente 20014 apresentou uma alteração no gene *LPL* (S447X), uma alteração no gene *APOA-V* (S19W) e duas alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2); o doente 20071 apresentou uma alteração no gene *USF1* (USF1s1); o doente 26009 apresentou uma alteração no gene *APOA-V* (D332fsX336) não descrita e duas alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2); o doente 26035 apresentou uma alteração no gene *LPL* (S447X) e uma alteração no gene *USF1* (USF1s2); o doente 26056 apresentou uma alteração no gene *USF1* (USF1s1); o doente 26086 apresentou uma alteração no gene *APOA-V* (S19W); e o doente 27026 apresentou uma alteração no gene *LPL* (A433V) não descrita e uma alteração no gene *USF1* (USF1s1). Assim, 40% (4/10) dos doentes com fenótipo sugestivo de FCHL tinham alterações no gene *LPL*, 30% (3/10) tinham alterações no gene *APOA-V* e 70% (7/10) tinham pelo menos um dos polimorfismos do gene *USF1* associados à FCHL.

Um estudo de van der Vleuten e colaboradores <sup>[77]</sup> sobre a associação de variantes do gene *APOA-V* e a FCHL demonstrou que os portadores da alteração S19W tinham um risco aumentado para a FCHL e um perfil lipídico mais aterogénico, com um aumento de cerca de 22% nos TGs e de aproximadamente 5% nos valores de apo B quando comparados com os homozigóticos para o alelo normal S19. Assim, tendo em conta os resultados obtidos por van der Vleuten e colaboradores e os resultados obtidos neste estudo, pode-se afirmar que para além de ser responsável pelo aumento dos níveis de TGs, o polimorfismo S19W no gene *APOA-V* está associado à FCHL. Relativamente aos resultados obtidos através da análise do gene *USF1*, pode-se verificar que a maioria dos doentes com fenótipo sugestivo de FCHL possuem pelo menos um dos dois polimorfismos que vários estudos demonstram estar associados a esta patologia <sup>[64,66,79,80]</sup>, confirmando-se assim essa associação. No que diz respeito ao polimorfismo S447X no gene *LPL*, um estudo de Wung e colaboradores <sup>[30]</sup> que relaciona este polimorfismo com a FCHL, demonstrou que este é um polimorfismo protector e que é menos frequente nos doentes com FCHL do que nos indivíduos normais. No presente estudo foi analisado um painel de 50 normolipidemicos onde foi encontrado o polimorfismo S447X com uma frequência de 18%. A média dos valores de TGs para este painel foi de 75.4±33.6 mg/dL e a média dos valores de TGs nos indivíduos desse painel onde foi encontrada a alteração S447X foi de 82.5±37.5 mg/dL. Isto permite inferir que o polimorfismo S447X não está a favorecer a actividade da enzima nem a provocar uma diminuição dos valores de TGs como descrito por Wung e colaboradores <sup>[30]</sup> e outros autores <sup>[83,84,85,86]</sup>, uma vez que a media de TGs dos indivíduos com este polimorfismo é superior à média de TGs dos indivíduos normais e não portadores desta alteração. No entanto, não é possível comparar a frequência do polimorfismo S447X obtida no painel de 50 normolipidemicos com a frequência encontrada nos doentes com fenótipo sugestivo de FCHL uma vez que esta amostra é muito reduzida.

### 4.2.3 Outras Patologias

Nos 3 casos índice com hipertrigliceridemia mas que não se enquadram nas duas patologias anteriores, 2 possuíam alterações em alguns dos genes em estudo: o doente 26003 apresentou uma alteração no gene *APOA-IV* (Q360H) já descrita<sup>[53]</sup> e uma alteração no gene *USF1* (USF1s1); e o doente 26068 apresentou uma alteração no gene *LPL* (N291S) já descrita<sup>[73]</sup> e uma alteração no gene *USF1* (USF1s1). De acordo com estes resultados fica claro que a apo A-IV desempenha um importante papel na redução dos TGs em circulação, uma vez que a alteração Q360H neste gene provocou a elevação destes lípidos no caso índice 26003, como demonstrado por vários estudos<sup>[81,82]</sup>. Por outro lado, estes resultados permitem confirmar a importância do polimorfismo USF1s1 no desenvolvimento de hipertrigliceridemia. Assim, foi encontrada uma possível causa para o nível elevado de TGs em 2 dos 3 doentes com hipertrigliceridemia mas que não se enquadram nem na FLLD nem na FCHL.

## 4.3 Casos Índice e alterações encontradas nos genes em estudo

### 4.3.1 Casos índice 99004 e 26035 – Polimorfismo S447X (*LPL*) e polimorfismos USF1s1 e USF1s2 (*USF1*)

As doentes 99004 e 26035 são ambas do sexo feminino com 66 e 69 anos respectivamente. Ambas apresentam um fenótipo sugestivo de FCHL, com valores elevados de TGs, CT e apo B (valores apresentados na tabela 3.2). A doente 99004 já sofreu um AVC e enfarte do miocárdio aos 47 anos e angina de peito, mas não está a ser medicada para o colesterol e TGs. A doente 26035 já sofreu um evento cardiovascular (angina de peito) e está a ser medicada com estatinas. Estas doentes foram inicialmente recrutadas para o estudo da FH e uma vez que não foram encontradas alterações no genes responsáveis por essa dislipidemia foram encaminhados para este estudo. A análise molecular dos genes *LPL*, *USF1* e das lipoproteínas em estudo revelou, em ambas as doentes, uma alteração em no gene *LPL* (S447X), duas alterações no gene *USF1* (USF1s1 e USF1s2) na doente 99004 e uma alteração no gene *USF1* (USF1s2) na doente 26035.

O polimorfismo S447X é um dos polimorfismos mais frequentes da *LPL* com uma incidência de 17-22%<sup>[83]</sup> na população caucasiana e resulta da alteração de uma citosina por uma guanina na posição c.1595, resultando num codão stop prematuro na posição 447 da proteína madura e consequentemente numa proteína truncada com menos 2 aminoácidos (Ser<sup>447</sup> e Gly<sup>448</sup>). Vários estudos defendem que a variante S447X aumenta a expressão e actividade da *LPL*, com diminuição dos níveis de TGs, um leve aumento da concentração de c-HDL e uma diminuição do risco de DCV<sup>[83,84]</sup>. Estudos em ratinhos com deficiência em *LPL*, fatal nestes

animais, demonstraram que ratinhos injectados com um vector contendo LPL-S447X sobreviviam ao contrário de ratinhos injectados com LPL-WT (*wild type*)<sup>[85,86]</sup>, reforçando a ideia de que o polimorfismo S447X é de facto um ganho de função. A serina na posição 447 pertence ao domínio C-terminal (resíduos 313-448) da proteína madura, que também está envolvido na ligação a receptores e lipoproteínas e à ligação ao sulfato de heparano<sup>[87]</sup>. Assim, a ausência dos dois últimos aminoácidos da proteína pode potenciar e aumentar a remoção dos TGs das quilomicras e VLDL, através de uma conformação mais favorável. No entanto, o mecanismo de acção não foi ainda totalmente clarificado. A presença desta alteração nestas doentes e os resultados obtidos no painel de normolipidemicos contrariam a hipótese de o alelo 447X do gene *LPL* ser um alelo protector, como afirmado nos estudos acima descritos, uma vez que estas doentes possuem níveis aumentados de TGs e já sofreram ambas um evento cardiovascular. Mesmo que o polimorfismo S447X não esteja na origem da hipertrigliceridemia destas doentes e até possa ter um efeito benéfico, estes casos índice possuem, no caso da doente 99004 dois polimorfismos do gene *USF1* e no caso da doente 26035 apenas um que, como discutido no ponto 4.2.2, estão associados à FCHL, sendo por isso o *USF1* um bom candidato a gene causador desta dislipidemia nestas doentes. Por outro lado, se o efeito benéfico do alelo 447X, defendido pelos vários estudos acerca do ganho de função desta alteração, forem confirmados pode-se colocar a hipótese de que, se estas doentes não possuíssem este alelo no gene *LPL*, os seus valores de TGs poderiam ser muito mais elevados.

#### **4.3.2 Caso índice 20014 – Polimorfismo S447X (*LPL*), polimorfismo S19W (*APOA-V*) e polimorfismos USF1s1 e USF1s2 (*USF1*)**

O caso índice 20014 é um senhor de 49 anos, com um perfil lipídico que se enquadra na FCHL, fumador e com valores aumentados de TGs (212 mg/dL), CT (252 mg/dL) e apo B (163 mg/dL) mesmo após tratamento com estatinas. Uma vez que não foram encontradas alterações nos 3 genes responsáveis pela FH este doente foi incluído neste estudo. A análise molecular dos genes em estudo revelou várias alterações: o polimorfismo S447X no gene *LPL*, o polimorfismo S19W no gene *APOA-V* e os polimorfismos USF1s1 e USF1s2 no gene *USF1*.

A alteração C>G na posição c.56 do gene *APOA-V* resulta na substituição de uma serina por um triptofano na posição 19 da proteína. Esta alteração, por si só, define o haplotipo *APOA-V*\*3, associado a um aumento dos níveis séricos de TGs<sup>[77]</sup>. O polimorfismo S19W afecta a translocação da proteína com redução de duas vezes na sua secreção comparativamente com a proteína normal<sup>[88]</sup>. Foram feitos estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* que tornam consistente a afirmação de que esta alteração provoca um aumento significativo dos níveis séricos de TGs<sup>[78]</sup>, mesmo em heterozigotia<sup>[75]</sup> e, como foi discutido no ponto 4.2.2, está associada à FCHL. Uma

vez que a apo A-V acelera a hidrólise das lipoproteínas ricas em TGs pela LPL, pois facilita a interacção da enzima com estas partículas <sup>[60,58]</sup>, um valor reduzido de apo A-V funcional resultantes da alteração S19W, pode ter um efeito negativo na actividade da LPL <sup>[89]</sup>, sendo responsável pela hipertrigliceridemia presente. O processo de interacção entre a apo A-V e a LPL não é, no entanto, claramente conhecido.

Para além do polimorfismo S19W associado à FCHL este caso índice possui também os dois polimorfismos do *USF1* associados a essa mesma dislipidemia e portanto, a associação destas 3 alterações pode ser a causa da hipertrigliceridemia apresentada por este doente. Mais uma vez, o facto deste caso índice também possuir o alelo 447X, discutido no ponto 4.3.1, pode fazer com os valores lipídicos deste doente não sejam tão elevados como poderiam ser se não tivesse este polimorfismo que muitos defendem ser protector. Para além disso, o caso índice é fumador, o que contribui para o aumento dos seus níveis séricos de TGs. O estudo familiar adicional não revelou nenhuma destas alterações no filho deste doente, como era de esperar, uma vez que tem valores normais de TGs (74 mg/dL) e CT (170 mg/dL).

#### **4.3.3 Casos índice 20071 e 26056 – Polimorfismo USF1s1 (*USF1*)**

Os casos índice 20071 e 26056 têm ambos um fenótipo sugestivo de FCHL. A doente 20071 é uma senhora de 48 anos com valores elevados de TGs (284 mg/dL), CT (325 mg/dL) e apo B (240 mg/dL), mesmo após o tratamento com estatinas e o doente 26056 é um senhor de 51 anos igualmente com valores elevados de TGs (250 mg/dL) e CT (270 mg/dL), mas que não está a ser medicado. Os valores de apo B do caso índice 26056 não foram determinados. Inicialmente pensou-se que estes doentes tivessem FH, uma vez que os valores de colesterol eram tão elevados em ambos. No entanto, após a análise molecular dos 3 genes responsáveis pela FH, que não revelou qualquer alteração, foram encaminhados para este estudo, uma vez que os seus fenótipos eram também sugestivos de FCHL e procedeu-se à análise dos genes envolvidos não só na FCHL como também no metabolismo dos TGs. A única alteração encontrada nestes doentes foi o polimorfismo USF1s1 no gene *USF1* que, como discutido anteriormente está associado à FCHL, podendo ser responsável pelo perfil lipídico destes dois doentes.

#### **4.3.4 Caso índice 26003 – Polimorfismo Q360H (*APOA-IV*) e polimorfismo USF1s1 (*USF1*)**

O caso índice 26003 é uma doente de 41 anos com valores muito elevados de TGs (763 mg/dL) antes do tratamento com estatinas e fibratos. Os valores de TGs apresentados por esta

doente são mais baixos do que os encontrados em doentes com FLLD mas são bastante superiores aos apresentados por doentes com alterações em heterozigotia no gene *LPL*, podendo ter uma alteração num outro gene em estudo. Deste modo, esperava-se encontrar uma mutação em heterozigotia no gene *LPL*, facto que não se verificou.

Apesar de não se ter encontrado uma alteração no gene *LPL*, foi encontrada uma alteração no exão 3 do gene *APOA-IV* que é um modelador da actividade da LPL. A alteração de uma glutamina por uma histidina na posição 360 da proteína madura (Q360H) é um dos polimorfismos da apo A-IV mais bem estudados possuindo uma frequência de 7-9% na Europa Ocidental<sup>[81]</sup> e dando origem à isoforma A-IV-2. Esta substituição aumenta significativamente a afinidade lipídica e tempo de permanência no plasma da isoforma apoA-IV-2 e está associada a hipertrigliceridemia<sup>[82]</sup>. Hockey e colaboradores<sup>[81]</sup> verificaram que indivíduos heterozigóticos para o alelo A-IV-2 possuíam valores de TGs mais elevados que os indivíduos homozigóticos para o alelo normal A-IV-1. Esta observação sugere que o alelo A-IV-2 atrasa a eliminação das lipoproteínas ricas em TGs e isto pode ocorrer por dois mecanismos: 1) para que possa ocorrer a hidrólise das quilomicras, a apo A-IV à sua superfície deve ser substituída pela apo C-II, transferida pelas HDL, que irá activar a LPL. No entanto, devido à alta afinidade da isoforma apo A-IV-2 para as lipoproteínas, o processo de adsorção da apo C-II pode ser comprometido, não ocorrendo activação da LPL, dando origem a uma hidrólise deficiente; 2) as quilomicras remanescentes são removidas da circulação por receptores hepáticos de remanescentes. A apo E serve como ligando neste processo e tem que ser adquirida pelas quilomicras. Tal como acontece com a apo C-II, também tem de ocorrer uma troca entre a apo A-IV e a apo E para que o processo de eliminação dos remanescentes seja eficiente. O facto da isoforma A-IV-2 ter alta afinidade para as lipoproteínas pode impedir a aquisição da apo E e comprometer a eficiente eliminação das quilomicras remanescentes.

Assim, a hipertrigliceridemia presente na doente 26003 poderá dever-se à deficiente hidrólise ou remoção das quilomicras e VLDL, proporcionada pelo polimorfismo Q360H e pelo polimorfismo USF1s1, envolvido, como já foi dito, no desenvolvimento de hipertrigliceridemia. O estudo familiar adicional não revelou nenhuma destas alterações nos dois filhos deste doente, como era de esperar, uma vez que têm valores normais de TGs (40 mg/dL e 50 mg/dL) e CT (138 mg/dL e 158 mg/dL).

#### **4.3.5 Caso índice 26009 – Mutação D332fsX336 (*APOA-V*) e polimorfismos USFs1 e USFs2 (*USF1*)**

Este caso índice é um adulto de 42 anos que possuía valores elevados de TGs (1095 mg/dL) antes do tratamento, altura em que bebia bebidas alcoólicas com muita regularidade. Os



valores de CT e apo B não foram determinados antes do doente começar a ser medicado. Este doente deixou de consumir álcool e começou a ser medicado com fibratos, tendo sofrido uma redução dos seus valores de TGs que, ainda assim, permaneceram elevados (300 mg/dL), tendo também valores ligeiramente aumentados de colesterol total (232 mg/dL) e valores de apo B superiores a 120 mg/dL (133.4 mg/dL). O fenótipo deste doente era sugestivo de FH ou FCHL. O estudo de FH foi realizado, não tendo sido encontradas alterações nos 3 genes associados a essa dislipidemia. Assim, procedeu-se ao estudo da LPL e apolipoproteínas envolvidas no metabolismo lipídico.

A análise molecular do gene *APOA-V* deste caso índice, revelou um pequeno rearranjo ainda não descrito caracterizado pela deleção de 4 bases (ACAG), duas no aminoácido da posição 332 e duas no aminoácido da posição 333, que causa alteração na grelha de leitura (*frameshift*) e aparecimento de codão stop prematuro na posição 336 da proteína madura. O alinhamento da sequência humana deste gene com as sequências de 11 espécies de vertebrados demonstrou que a região delectada é conservada entre espécies denotando a sua importância. Esta mutação afecta o domínio C-terminal da apo A-V, onde Sun e colaboradores <sup>[90]</sup> confirmaram existir um local de ligação lipídica (resíduos 301-343). Nesse estudo também foi encontrado um local de activação da LPL (resíduos 192-238) e demonstrado que uma deleção dos resíduos 301-343 da proteína diminuía em 2/3 a actividade da LPL, embora não afectasse directamente a região envolvida na activação desta enzima. Assim, a mutação D332fsX336 não afecta directamente a activação da LPL mas fá-lo indirectamente, uma vez que a apo A-V alterada perde o local de ligação às lipoproteínas não conseguindo por isso interagir com a LPL de modo a modelar a sua actividade enzimática, o que resulta numa diminuição da lipólise e num aumento dos níveis séricos de TGs. Esta mutação no gene *APOA-V* em conjunto com os dois polimorfismos do *USF1* são a possível causa da hipertrigliceridemia encontrada neste doente.

O fenótipo do doente é bastante sugestivo de FCHL e as alterações encontradas em genes associados a essa dislipidemia reforçam esse diagnóstico. Terão que ser feitos estudos funcionais para determinar com exactidão o efeito da mutação D332fsX336 na apo A-V e quais as suas consequências na actividade da LPL e no metabolismo das proteínas ricas em TGs. Também terá que ser realizado o estudo adicional dos familiares deste caso índice de forma a ver se a mutação co-segrega com o fenótipo de FCHL na família.

#### **4.3.6 Caso índice 26068 – Polimorfismo N291S (*LPL*) e polimorfismo USF1s1 (*USF1*)**

O caso índice 26068 é um indivíduo masculino de 58 anos que já sofreu um evento cardiovascular (claudicação) e que possuía valores muito aumentados de TGs (413 mg/dL) e CT (301 mg/dL) antes de iniciar tratamento com estatinas e fibratos. O fenótipo deste doente era sugestivo de FH, tendo sido analisados os genes *LDLR*, *PCSK9* e *APOB*, que não apresentavam alterações. Após ter sido afastada a hipótese de este doente ter FH, foi feito o estudo da *LPL*, apolipoproteínas e *USF1*. A análise molecular dos genes em estudo revelou um polimorfismo no gene *LPL* e outro no gene *USF1*.

O polimorfismo N291S, no exão 6 resulta da alteração de uma adenina por uma guanina na posição c.1127, dando origem à substituição de uma asparagina na posição 291 da proteína madura por uma serina. A Asp<sup>291</sup> localiza-se no domínio N-terminal da *LPL*, mais especificamente no local de ligação ao sulfato de heparano [28]. Assim, o polimorfismo N291S reduz a afinidade da *LPL* ao sulfato de heparano e favorece a monomerização em vez da dimerização [91,92]. Uma vez que a *LPL* só está activa sob forma de dímero, este polimorfismo reduz a actividade catalítica desta enzima. Este polimorfismo é relativamente frequente e provoca um aumento de aproximadamente 31% nos níveis séricos de TGs, no entanto, por si só não leva a deficiência familiar em *LPL* [28]. Apesar desta variante não aumentar o risco de DCV na população em geral, em doentes com FCHL aumenta em mais de três vezes esse risco [29].

O caso índice 26068 já sofreu um episódio cardiovascular, que pode estar associado à alteração encontrada no gene *LPL*, cuja patogenicidade pode ser aumentada por outros factores como índice de massa corporal e colesterol elevados também presentes neste doente. Para além deste polimorfismo no gene *LPL*, este caso índice possui o polimorfismo USF1s1 no gene *USF1*. Estas alterações (USF1s1 e N291S) são, possivelmente, a causa da hipertrigliceridemia neste doente. O estudo familiar adicional não revelou nenhuma destas alterações em dois dos irmãos deste doente, como era esperado pois têm valores normais de TGs (134 mg/dL e 104 mg/dL) e CT (110 mg/dL e 117 mg/dL) embora ambos já tenham sofrido um evento cardiovascular.

#### **4.3.7 Caso índice 26086 e 28025 – Polimorfismo S19W (*APOA-V*)**

O caso índice 26086 é um senhor de 41 anos com fenótipo sugestivo de FCHL apresentando, após tratamento com estatinas, valores elevados de TGs (372 mg/dL), CT (251 mg/dL) e apo B (136.5 mg/dL) e tendo já sofrido um enfarte do miocárdio. Já a doente 28025 é uma senhora de 38 anos que apresentava suspeita clínica de FLLD, tendo valores elevadíssimos de TGs mesmo em tratamento com fibratos (2761 mg/dL). O doente 26086 foi inicialmente

recrutado para o estudo da FH, onde não foram encontradas alterações nos 3 genes envolvidos nessa dislipidemia. Assim, foi feito o estudo molecular do gene *LPL*, *USF1* e apolipoproteínas envolvidas no metabolismo lipídico tanto para o doente 26086 como para a doente 28025, no qual foi encontrada a alteração S19W em ambos. No primeiro caso a alteração S19W já discutida no ponto 4.3.2 pode estar na origem dos níveis aumentados de triglicéridos nesse doente. No segundo caso, é possível que existam alterações em outros genes que não os estudados ou alguma outra patologia que estejam a causar, juntamente com a S19W, este fenótipo na doente, uma vez que também possui valores muito altos de colesterol (433 mg/dL).

#### **4.3.8 Caso índice 27026 – Alteração A433V (*LPL*) e polimorfismo USF1s1 (*USF1*)**

O doente 27026 é um senhor de 58 anos cujo fenótipo foi interpretado inicialmente como sendo resultado de uma Hipercolesterolemia Familiar, uma vez que possuía valores elevados de colesterol (292 mg/dL) bem como todos os seus 3 filhos. Foi feito o estudo molecular dos genes envolvidos na FH e foi feito o estudo adicional nos três filhos do doente, não tendo sido encontradas quaisquer alterações. Dois dos filhos deste caso índice (27028 e 27030) possuíam, para além de valores altos de colesterol (298 mg/dL e 284 mg/dL respectivamente), valores elevados de TGs (223 mg/dL e 224 mg/dL respectivamente) e um dos filhos (27029) possuía apenas valores elevados de colesterol (294 mg/dL) tendo os valores de TGs abaixo do valor recomendado (124 mg/dL) pela Sociedade Europeia de Cardiologia. Uma vez que este doente também apresentava valores aumentados de TGs (265 mg/dL) e uma família em que estavam presentes diferentes perfis lipídicos, foi dirigido para o estudo da FCHL, tendo sido realizado o estudo molecular do gene *LPL*, das apolipoproteínas envolvidas no metabolismo dos TGs e do gene *USF1*, no doente e nos seus 3 filhos. O resultado do estudo do gene *LPL* nestes indivíduos foi a descoberta de uma alteração A433V no caso índice, em um dos filhos com TGs elevados (27028) e no filho com TGs normais (27029).

A partir destes resultados é possível inferir que esta alteração não afecta negativamente a actividade da LPL uma vez que um dos filhos com o alelo mutado 433V tinha valores normais de triglicéridos. No entanto, para reforçar esta ideia foi analisado um painel de 50 indivíduos normolipídemicos onde foi encontrada esta alteração num desses indivíduos, cujo valor de triglicéridos era inferior a 60 mg/dL. Assim, apesar da Ala<sup>433</sup> se localizar junto à região de ligação ao sulfato de heparano no domínio C-terminal da LPL<sup>[28,87]</sup>, pode-se afirmar que a sua alteração para uma valina não tem efeito negativo no metabolismo das quilomicras e VLDL por parte desta enzima.

O estudo molecular do gene *USF1* no caso índice e nos 3 filhos, resultou na identificação do polimorfismo USF1s1 no caso índice e no filho 27028. O filho 27029, que tinha valores normais de TGs, não possuía esta alteração, como era esperado. Já o filho 27030, que tinha valores aumentados de CT e TGs também não possuía esta alteração. Como tal, os valores elevados de TGs e CT no caso índice 27026 e no seu filho 27028 pode ser justificados pela presença deste polimorfismo e/ou por alguma patologia e/ou alterações noutros genes que não os estudados, uma vez que o IMC deste doente é normal e não existem factores externos como o consumo de álcool ou tabaco.

#### **4.3.9 Caso índice 28053 – Polimorfismos USF1s1 e USF1s2 (*USF1*)**

O doente 28053 é um indivíduo do sexo masculino, de 28 anos, com valores elevados de colesterol (433 mg/dL) e elevadíssimos de TGs (2761 mg/dL), no qual havia suspeita clínica de FLLD. No entanto, este caso índice sofria também de diabetes. Apesar deste doente ser diabético, devido aos valores elevadíssimos de TGs que apresentava e ao facto de ter uma pancreatite, foi recrutado para o presente estudo. Foram então estudados o gene *LPL* e os genes das apolipoproteínas envolvidas no metabolismo dos TGs, nos quais não foram encontradas alterações. Por outro lado, o estudo molecular do gene *USF1* revelou os polimorfismos USF1s1 e USF1s2, que juntamente com a diabetes, podem estar na origem da dislipidemia presente neste doente.

#### **4.3.10 Caso índice 28268 – Mutações G188E e S259G (*LPL*) e polimorfismos USF1s2 (*USF1*)**

Este caso índice é uma rapariga de 14 anos, com valores muito elevados de triglicerídeos (1156 mg/dL) e um soro fortemente lipémico, possuindo um fenótipo sugestivo de FLLD. Esta dislipidemia foi confirmada pela descoberta de uma heterozigotia composta, com as mutações G188E no exão 5 e S259G no exão 6 do caso índice. O estudo adicional dos familiares identificou uma heterozigotia para a mutação G188E na mãe e uma heterozigotia para a mutação S259G no pai.

A mutação G188E é a mutação mais frequente na *LPL* e a principal causa de deficiência nesta proteína. Esta mutação aumenta os TGs em 80% e a actividade da enzima é quase nula ou mesmo nula <sup>[27,29]</sup>. A alteração da glicina por um ácido glutâmico na posição 188 da proteína madura afecta a região central de homologia cuja sequência é fortemente conservada entre as várias lipases e entre várias espécies e que inclui a região de ligação ao substrato (resíduos 91-95, 157-160 e 187-196) <sup>[28]</sup>. Apesar desta mutação não afectar directamente o local de ligação ao

sulfato de heparano (resíduos 147-151, 261-287, 290-302) <sup>[28]</sup>, a conformação da proteína alterada afecta esta ligação, como demonstrou Peterson e colaboradores <sup>[93]</sup> num estudo funcional desta e outras mutações no exão 5 do gene *LPL*. Emi e colaboradores <sup>[27]</sup> chegaram à mesma conclusão num estudo do efeito *in vivo* desta mutação. Assim, a proteína alterada possui uma deficiência funcional que se traduz numa deficiência na ligação ao sulfato de heparano e consequentemente não se situa no seu local de acção nem exerce a sua função, resultando numa acumulação de quilomicras e VLDL ricos em TGs.

A serina na posição 259 faz parte do domínio N-terminal (resíduos 1-312) da proteína madura, que inclui o centro activo (Ser<sup>132</sup>, Asp<sup>156</sup> e His<sup>241</sup>), a região de ligação ao substrato (resíduos 91-95, 157-160 e 187-196) e a região de ligação ao sulfato de heparano (resíduos 147-151, 261-287, 290-302) <sup>[28,94]</sup>. Os efeitos do alelo mutado 259G na estrutura da proteína ainda não foi determinados mas provavelmente haverá uma alteração conformacional que afectará uma ou mais das regiões acima descritas, uma vez que o aminoácido 259 se encontra próximo ao aminoácido His<sup>241</sup> do centro activo e ao aminoácido Ala<sup>261</sup> da região de ligação ao substrato, resultando numa deficiência funcional da enzima e acumulação de lipoproteínas ricas em TGs. Uma outra mutação no codão 259, S259R, também revelou ausência de actividade enzimática por parte da LPL *in vitro* e *in vivo*, o que reforça a importância deste aminoácido que é conservado entre espécies <sup>[95,96,97]</sup>. A mãe do caso índice apresentava valores elevados de TGs (256 mg/dL) e era heterozigótica para a mutação G188E. Já o pai também possuía valores elevados de TGs (353 mg/dL) mas era heterozigótico para a mutação S259G. Os valores de TGs apresentados pelos pais são bastante elevados em relação aos valores recomendados (<150 mg/dL) embora a FLLD seja considerada uma patologia recessiva, mas está descrito que alterações em heterozigotia provocam uma diminuição da actividade da enzima provocando hipertrigliceridemia <sup>[34]</sup>. Este facto faz repensar o carácter recessivo desta doença uma vez que mesmo em heterozigotia os indivíduos podem já apresentar algum fenótipo.

Pelos valores de TGs de um e do outro pode-se inferir que a mutação S259G afecta mais severamente a enzima LPL e tendo em conta a estrutura da proteína e a localização do aminoácido Ser<sup>259</sup> no domínio N-terminal, a alteração deste pode influenciar principalmente o centro activo, uma vez que se localiza muito próximo deste, sendo por isso mais severa que a G188E que afecta a ligação ao substrato.

Assim, a causa da FLLD neste caso índice foi encontrada e deve-se a uma heterozigotia composta das mutações G188E e S259G.

#### 4.4 Doentes sem alterações em nenhum dos genes estudados

Dos 20 casos índice estudados, 7 (35%) não apresentam alterações em nenhum dos genes estudados. Dois destes 7 doentes tinham fenótipo sugestivo de FCHL, 4 tinham suspeita clínica de FLLD e 1 não se enquadrava nestas patologias mas apresentava hipertrigliceridemia. A suspeita clínica de FLLD nos 4 doentes referidos (27126, 28094, 28250 e 28301) não se confirmou uma vez que não possuíam alterações no gene *LPL* nem nos genes estudados que afectam a actividade da enzima e provocam fenótipo semelhante. Assim, a sua hipertrigliceridemia severa pode ter origem em outra patologia ou genes que não os estudados neste trabalho. A hipertrigliceridemia nos 2 doentes com suspeita clínica de FCHL (20060 e 28051) e no doente que não se incluía nesta patologia nem na FLLD (26046) pode dever-se também a alterações em outros genes, uma vez que ainda pouco se sabe sobre as causas genéticas da FCHL, e/ou em outras patologias e factores externos. Segundo as respostas de cada um destes casos índice às perguntas do questionário relacionadas com o consumo de álcool e hábitos tabágicos, nenhum deles assumiu consumir álcool e apenas um deles (caso índice 20060) assumiu ser ex fumador, e portanto, estes factores externos não devem ser considerados como causadores da hipertrigliceridemia apresentada nestes doentes.

O doente 20060 é um adulto de 54 anos que apresentava valores aumentados de TGs e colesterol total (319 mg/dL e 340 mg/dL respectivamente) antes de iniciar tratamento com estatinas, permanecendo com valores aumentados após o tratamento (253 mg/dL e 268 mg/dL respectivamente). Este doente tem valores de apo B acima de 120 mg/dL e sofre um evento cardiovascular, apresentando um fenótipo sugestivo de FCHL. Uma vez que não foram encontradas alterações em nenhum dos genes estudados, a hipertrigliceridemia deste doente pode estar relacionada com uma dieta rica em gorduras, uma vez que o seu IMC está acima do normal para homens (27.7 Kg/m<sup>2</sup>), com alguma outra patologia ou com alterações em outros genes não estudados.

O caso índice 26046 é um senhor de 47 anos com valores elevados de TGs (610 mg/dL) e IMC normal para homens (25.7 Kg/m<sup>2</sup>). Este doente tem diabetes pelo que essa patologia poderá estar na origem da hipertrigliceridemia apresentada.

O doente 28051 é um senhor de 44 anos, com valores elevados de TGs e colesterol total (400 mg/dL e 300 mg/dL respectivamente) e valores de apo B superiores a 120 mg/dL. A determinação dos parâmetros bioquímicos realizada no INSA demonstrou uma diminuição dos valores relativamente aos determinados anteriormente, embora o doente não tenha sido medicado. Assim, a hipertrigliceridemia apresentada inicialmente neste doente pode ser devida a hábitos alimentares incorrectos, como uma dieta rica em gorduras, que foram posteriormente corrigidos, levando à diminuição dos níveis séricos de TGs e CT.

#### 4.5 Medição da actividade da LPL e quantificação de apolipoproteínas

Geralmente, antes do estudo molecular do gene, realiza-se a medição da actividade enzimática da LPL, essencialmente por dois motivos: caso a actividade seja normal provavelmente não haverá alterações neste gene e seu cofactor (Apo C-II) e o estudo torna-se menos dispendioso uma vez que não se realiza a análise molecular; no caso de existir redução da actividade, é possível relaciona-la com a mutação. Para a medição da actividade da LPL existem kits disponíveis no mercado e de simples utilização. No entanto, para que as LPL se soltem dos proteoglicanos é necessária uma injeção intravenosa de heparina. Uma vez que nem todos os clínicos estavam de acordo com este procedimento não foi possível realiza-lo.

Um outro procedimento que teria sido de grande utilidade era a quantificação das apolipoproteínas em estudo, uma vez que permite inferir sobre a quantidade, em circulação, das lipoproteínas de que fazem parte. Este procedimento permitiria também avaliar o efeito de uma mutação na quantidade de apolipoproteína que é produzida. Foi encomendado para este estudo, um *kit* de quantificação de apolipoproteínas, no entanto não dispúnhamos de um aparelho essencial para a utilização do *kit* e apesar de nos ter sido disponibilizado esse aparelho na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, os ficheiros de análise de resultados não eram compatíveis, pelo que não foi possível realizar a técnica.

#### 4.6 Tratamento estatístico dos resultados obtidos

Embora fosse de interesse analisar estatisticamente os resultados obtidos, não foi feito nenhum tratamento estatístico dos mesmos, uma vez que a amostra era demasiado pequena e pouco significativa.

Todos os 20 doentes estudados foram recrutados do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, tendo o questionário e o consentimento informado sido feitos de acordo com essa dislipidemia. Os doentes que apresentavam uma hipertrigliceridemia típica da FLLD, não foram aceites pela coordenadora desse estudo por não cumprirem os critérios de inclusão, tendo sido encaminhados para o presente estudo. Outros doentes foram recrutados para o presente estudo por não terem sido encontradas alterações nos genes responsáveis pela FH e por apresentarem hipertrigliceridemia e/ou fenótipo sugestivo de FCHL.

Este estudo foi de grande importância uma vez que se conseguiu determinar uma possível causa genética para a hipertrigliceridemia em 13 (65%) dos 20 casos índice com dislipidemia familiar. Por outro lado, este estudo é também pioneiro no que diz respeito à FCHL e FLLD, sendo o primeiro em Portugal a desenvolver a análise molecular do gene *LPL* e genes

associados. Com este estudo foi também possível confirmar a associação dos genes *APOA-V* e *USF1* à FCHL e ao aumento dos níveis séricos de TGs.

O Grupo de Investigação Cardiovascular do INSA, pioneiro no estudo da FH na nossa população em 1999, continuará, no futuro, a realizar a análise molecular do gene *LPL* e apolipoproteínas. O nosso laboratório irá investir mais na FCHL, uma vez que é uma das dislipidemias mais comuns (1/200) e com maior incidência de DCV, para além de ser também uma das dislipidemias mais complexas e menos esclarecidas. A melhor caracterização do perfil lipídico dos doentes, para que se possa tentar classifica-los, também está nos planos da equipa de trabalho. Para tal, passará a ser realizada também a quantificação de várias apolipoproteínas envolvidas no metabolismo lipídico e que demonstraram ser importantes no processo destas patologias. Esta caracterização das apolipoproteínas poderá também ajudar a encontrar o defeito genético ou encaminhar os estudos numa direcção mais correcta.



## 5. Bibliografia

- [1] Carrageta M. A obesidade abdominal e as doenças cardiovasculares. (2006). Fundação Portuguesa de Cardiologia. 31:5. Acedido em: Junho de 2008 em: [http://cardiologia.brower.pt/docs/Newsletter\\_31.pdf](http://cardiologia.brower.pt/docs/Newsletter_31.pdf).
- [2] Schiavo M, Lunardelli A, Oliveira JR. (2003). Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 39(4):283-8.
- [3] Satoh H, *et al.* (2006). Fasting Triglyceride is a Significant Risk Factor for Coronary Artery Disease in Middle-Aged Japanese Men – Results From a 10-Year Cohort Study. *Circulation Journal*. 70:227-31.
- [4] Ravi GR, Pradeepa R, Mohan V. (2004). Hypertriglyceridemia and Coronary Artery Disease – An Update. *Indian Heart Journal*. 56:21-6.
- [5] Zandbergen F, Plutzky J. PPAR $\alpha$  in atherosclerosis and inflammation. (2007). *Biophys Acta*. 1771(8):972-82.
- [6] Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. (2004). Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*. 109:III2-7.
- [7] Tiwari S, *et al.* (2006). Atherosclerosis-related molecular alteration of the human Cav1.2 calcium channel  $\alpha_{1C}$  subunit. *PNAS*. 103(45):17024-9.
- [8] Andrade FM, Hutz MH. (2002). O componente genético da determinação dos lípidos séricos. *Ciência e Saúde Coletiva* 7(1):175-82.
- [9] Gofmann JW, de Lalla O, Glazier F. (1954). The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary artery disease. *Plasma*. 2:413–84.
- [10] Albrink MJ, Mann EB. (1959). Serum triglycerides in coronary artery disease. *Arch Intern Med*. 103:4–8
- [11] Austin MA, *et al.* (2004). Familial Hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol*. 160(5):421-9.

- [12] Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. (2007). Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ*. 176(8):1113-20.
- [13] Lehninger AL, Cox MM, Nelson DL. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed, W.H. Freeman and Company. New York. p.345-7/354-5/631-3.
- [14] Gleissner AC, *et al.* (2007). Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech*. 4(3):131-40.
- [15] Braun JEA, Severson DL. (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J*. 287:337-47.
- [16] Walker HK, Hall WD, Hurst JW. (1990). *Clinical Methods – The History, Physical, and laboratory Examinations*. 3<sup>rd</sup> ed. Butterworth Publishers; p153-60. Acedido em: Junho de 2008 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm&part=A951>.
- [17] Novak EM, Bydlowski SP. (1996). *Biologia Molecular das Dislipidemias: Variação Genética das Apolipoproteínas*. *Arq Bras Cardiol*. 67(6):411-17.
- [18] Miller NE. (1979). Plasma lipoproteins, lipid transport, and atherosclerosis: Recent developments. *Journal of Clinical Pathology*. 32:639-50.
- [19] Scriver CR, Beaudet AL, Valle, Sly WS. (2001). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 8<sup>th</sup> ed, McGraw-Hill editors. USA. p1841-1931.
- [20] Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. (1999). Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood E, editors. *Text Book of Clinical Chemistry*. 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders & Co. Philadelphia. p.809-61.
- [21] Breslow JL. (1989). Genetic basis of lipoprotein disorders. *J Clin Invest*. 84(2):373-80.
- [22] Goldberg IJ. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research*. 37:693-707.
- [23] Clee SM, *et al.* (2000). Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. 41:521-31.

- [24] Pentikäinen MO, *et al.* (2002). Lipoprotein Lipase in the Arterial Wall – Linking LDL to the Arterial Extracellular matrix and Much More. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 22:211-7.
- [25] Monsalve MV, *et al.* (1990). A Missense Mutation at Codon 188 of the Human Lipoprotein Lipase Gene Is a Frequent Cause of Lipoprotein Lipase deficiency in Persons of Different Ancestries. *J Clin Invest.* 86:728-734.
- [26] Karpe F, *et al.* (1998). Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissues in regulation of plasma lipoprotein lipase concentrations. *Journal of Lipid Research.* 39:2387-93.
- [27] Emi M, *et al.* (1990). Missense Mutation (Gly  $\rightarrow$  Glu<sup>188</sup>) of Human Lipoprotein Lipase Imparting Functional Deficiency. *The Journal of Biological Chemistry.* 265(10):5910-16.
- [28] van Tilbeurgh H, *et al.* (1994). Lipoprotein Lipase – Molecular Model Based on The Pancreatic Lipase X-Ray Structure: Consequences for Heparin Binding and Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry.* 269(6):4626-33.
- [29] Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *Journal of Lipid Research.* 43(12):1997-2006.
- [30] Wung SF, *et al.* (2006). The lipoprotein lipase gene in combined hyperlipidemia: evidence of a protective allele depletion. *Lipids in Health and Disease.* 5(1):19-26.
- [31] Garenc C, *et al.* (2006). Gene polymorphisms in the Quebec population: A risk to develop hypertriglyceridemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 344(2):588-96.
- [32] Gilbert B, *et al.* (2001). Lipoprotein lipase (LPL) deficiency: a new patient homozygote for the preponderant mutation gly88-to-glu in the human LPL gene and review of reported mutations: 75% are clustered in exon 5 and 6. *Ann Genet.* 44(1):25-32.
- [33] Mailly F, *et al.* (1997). Familial Lipoprotein Lipase (LPL) Deficiency: A Catalogue of LPL Gene Mutations Identified in 20 Patients From the UK, Sweden, and Italy. *Human Mutation.* 10(6):465-73.

- [34] Babirak SP, *et al.* (1989). Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 9(3):326-34.
- [35] Brunzell JD. (2007). Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. *Gene Reviews*. Acedido em: Agosto de 2008 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=lpl>.
- [36] Kawashiri M, Rader DJ. (2000). Gene therapy for lipid disorders. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 1(2): 120–7.
- [37] Gaddi A, *et al.* (2007). Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date. *Vascular Health and Risk Management.* 3(6):877-86.
- [38] Shoulders CC, Jones EL, Naumova RP. (2004). Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease. *Hum Mol Genet.* 13:149-60.
- [39] Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. (2002). Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J R Soc Med.* 95(42):46-53.
- [40] Greevenbroek MMJ, Vermeulen VM, Bruin TWA. (2002). Familial combined hyperlipidemia plasma stimulates protein secretion by HepG2 cells: identifications of fibronectin in the differential secretion proteome. *Journal of lipid Research.* 43:1846-54.
- [41] Nevin DN, Brunzell JD, Deeb SS. (1994). The LPL gene in individuals with familial combined hyperlipidemia and decreased LPL activity. *Arterioscler thromb Vasc Biol.* 14(6):869-73.
- [42] Cabezas MC. (2003). Postprandial lipaemia in familial combined Hyperlipidaemia. *Biochemical Society Transactions.* 31(5):1090-3.
- [43] Sniderman A, Bailey SD, Engert JC. (2007). Familial combined hyperlipidaemia: how can genetic disorders be common, complex and comprehensible?. *Clinical Science.* 113:356-7.
- [44] Tuzgol S, *et al.* (1994). Apolipoprotein CII-Padova (Tyr<sup>37</sup> → stop) as a cause of chylomicronaemia in an Italian kindred from Siculiana. *J Med Genet.* 31:622-6.

- [45] Fojo SS, Law SW, Brewer HB. (1987). The human preproapolipoprotein C-II gene – Complete nucleic acid sequence and genomic organization. *FEBS Lett.* 213(1):221-6.
- [46] Baggio G, *et al.* (1986). Apolipoprotein C-II Deficiency Syndrome – Clinical Features, Lipoprotein Characterization, Lipase Activity, and Correction of Hypertriglyceridemia after Apolipoprotein C-II Administration in Two Affected Patients. *The Journal of Clinical Investigation.* 77:520-7.
- [47] Jackson CL, Bruns GAP, Breslow JL. (1984). Isolation and sequence of a human apolipoprotein CII cDNA clone and its use to isolate and map to human chromosome 19 the gene for apolipoprotein CII. *Proc Natl Acad Sci.* 81:2945-9.
- [48] Dammerman M, *et al.* (1993). An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc natl Acad Sci.* 90:4562-6.
- [49] von Eckardstein A, *et al.* (1991). Apolipoprotein C-III (Lys<sub>58</sub> → Glu) – Identification of an Apolipoprotein C-III Variant in a Family with Hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 87:1724-31.
- [50] Maeda H, *et al.* (1987). Molecular cloning of a human apoC-III variant: Thr 74 → Ala 74 mutation prevents O-glycosylation. *Journal of Lipid Research.* 28:1405-9.
- [51] Chhabra S, *et al.* (2002). Apolipoprotein C3 SstI polymorphism and triglyceride levels in Asian Indians. *BMC Genetics.* 3:9.
- [52] Brewer HB, *et al.* (1974). The Complete Amino Acid Sequence of Alanine Apolipoprotein (apoC-III), an Apolipoprotein from Human Plasma Very Low Density Lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry.* 249(15):4975-84.
- [53] Lohse P, *et al.* (1990). Genetic Poyimorphism of Human Plasma Apolipoprotein A-IV Is Due to Nucleotide Substitutions in the Apolipoprotein A-IV Gene. *The Journal of Biological Chemistry.* 265(17):10061-64.
- [54] Karathanasis SK, *et al.* (1986). Structure, evolution, and polymorphisms of the human apolipoprotein A4 gene (*APOA4*). *Proc Natl Acad Sci.* 83:8457-61.

- [55] Elshourbagy NA, *et al.* (1987). Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(17):7973-81.
- [56] Goldberg IJ, *et al.* (1990). Lipoprotein ApoC-II Activation of Lipoprotein Lipase. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(8):4266-72.
- [57] Charlton-Menys V, Durrington PN. (2005). Apolipoprotein A5 and Hypertriglyceridemia. *Clinical Chemistry*. 51(2):295-7.
- [58] Rensen PCN, van Dijk KW, Havekes LM. (2005). Apolipoprotein AV: Low Concentration, High Impact. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:2445-7.
- [59] Vaessen SFC, *et al.* (2006). Apolipoprotein A-V, Triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-norfolk Population Study. *Journal of lipid Research*. 47:2064-70.
- [60] Merkel M, *et al.* (2005). Apolipoprotein AV Accelerates Plasma Hydrolysis of Triglyceride-rich Lipoproteins by Interaction with Proteoglycan-bound Lipoprotein Lipase. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(22):21553-60.
- [61] Putt W, *et al.* (2004). Variation in USF1 shows haplotype effects, gene: gene and gene: environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Human Molecular Genetics*. 13(15):1587-97.
- [62] Zeggini E, *et al.* (2006). Variations Within the Gene Encoding the Upstream Stimulatory Factor 1 Does Not Influence Susceptibility to Type 2 Diabetes in Samples From Populations With Replicated Evidence of Linkage to Chromosome 1q. *Diabetes*. 55:2541-8.
- [63] Collings A, *et al.* (2008). Allelic Variants of Upstream Transcription Factor 1 – Associate With Carotid Artery Intima-Media Thickness – The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation Journal*. 72:1158-64.
- [64] Pajukanta P, *et al.* (2004). Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet*. 36:371-6.
- [65] Schulz I. (2006). Tratamento das Dislipidemias - Como e Quando Indicar a Combinação de Medicamentos Hipolipemiantes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 50(2):344-59.

- [66] Shoulders CC, Naoumova RP. (2004). USF1 implicated in the aetiology of familial combined hyperlipidaemia and the metabolic syndrome. *Trends in Molecular Medicine*. 10(8):362-5.
- [67] Tziomalos K, Athyros VG. (2006). Fenofibrate: a novel formulation (Triglide™) in the treatment of lipid disorders: a review. *International Journal of Nanomedicine*. 1(2):129-47.
- [68] Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. (2008). Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc Health and Risk Manag*. 4(1):131-41.
- [69] Pahan K. (2006). Lipid-lowering drugs. *Cell Mol Life Sci*. 63(10):1165-78.
- [70] Tenenbaum A, Fisman EZ. (2004). Which is the best lipid-modifying strategy in metabolic syndrome and diabetes: fibrates, statins or both?. *Cardiovasc Diabetol*. 3:10.
- [71] Emi M, *et al.* (1990). Missense mutation (gly-to-glu188) of human lipoprotein lipase imparting functional deficiency. *J. Biol. Chem*. 265:5910-6.
- [72] Evans D, *et al.* (1998). Compound heterozygosity for a new (S259G) and a previously described (G188E) mutation in lipoprotein lipase (LpL) as a cause of chylomicronemia. *Human Mutation*. 12(3):217.
- [73] Reymer PWA, *et al.* (1995). A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. *Hum. Molec. Genet*. 4:1543-9.
- [74] Faustinella F, *et al.* (1991). Catalytic triad residue mutation (asp156-to-gly) causing familial lipoprotein lipase deficiency: co-inheritance with a nonsense mutation (ser447-to-ter) in a Turkish family. *J. Biol. Chem*. 266: 14418-14424.
- [75] Pennacchio LA, *et al.* (2002). Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum. Molec. Genet*. 11: 3031-3038.
- [76] Bourbon M, Rato Q. (2006). Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: presentation of the study and preliminary results. *Rev Port Cardiol*. 25(11):999-1013.

- [77] van der Vleuten GM, *et al.* (2007). Haplotype analyses of the *APOA5* gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Biochim Biophys Acta*. 1772(1):81-8.
- [78] Ahituv N, *et al.* (2007). In vivo characterization of human *APOA5* haplotypes. *Genomics*. 90(6):674-9.
- [79] Lee JC, *et al.* (2007). USF1 contributes to high serum lipid levels in Dutch FCHL families and U.S. whites with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27(10):2222-7.
- [80] van der Vleuten GM, *et al.* (2007). The involvement of upstream stimulatory factor 1 in Dutch patients with familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 48(1):193-200.
- [81] Hockey KJ, *et al.* (2001). Effect of the apolipoprotein A-IV Q360H polymorphism on postprandial plasma triglyceride clearance. *J Lipid Res*. 42(2):211-7.
- [82] Weinberg RB. (2002). Apolipoprotein A-IV polymorphisms and diet-gene interactions. *Curr Opin Lipidol*. 13(2):125-34.
- [83] Almeida KA, *et al.* (2007). The S447X polymorphism of lipoprotein lipase: effect on the incidence of premature coronary disease and on plasma lipids. *Arq Bras Cardiol*. 88(3):297-303.
- [84] Rip J, *et al.* (2006). Lipoprotein Lipase S447X: A Naturally Occurring Gain-of-Function Mutation. *Arterioscler, Thromb, and Vasc Biol*. 26(6):1236-45.
- [85] Rader DJ. (2005). Gain-of-Function Mutations and Therapeutic Implications: Lipoprotein Lipase S447X to the Rescue. *Arterioscler, Thromb, and Vasc Biol*. 25(10):2018-9.
- [86] Ross CJ, *et al.* (2005). Complete rescue of lipoprotein lipase-deficient mice by somatic gene transfer of the naturally occurring LPLS447X beneficial mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(10):2143-50.
- [87] Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. (2002). Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem*. 269(18):4701-10.
- [88] Talmud PJ, *et al.* (2005). Determination of the functionality of common *APOA5* polymorphisms. *J Biol Chem*. 280(31):28215-20.



- [89] Kovár J, Adámková V. (2008). Lipoprotein lipase activity determined in vivo is lower in carriers of apolipoprotein A-V gene variants 19W and -1131C. *Physiol Res.* 57(4):555-61.
- [90] Sun G, *et al.* (2006). Identification of lipid binding and lipoprotein lipase activation domains of human apoAV. *Chem Phys Lipids.* 143(1-2):22-8.
- [91] Hu Y, *et al.* (2006). A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. *J Lipid Res.* 47(9):1908-14.
- [92] Razzaghi H, *et al.* (2001). Structure-function analysis of D9N and N291S mutations in human lipoprotein lipase using molecular modelling. *J Mol Graph Model.* 19(6):487-94.
- [93] Peterson J, *et al.* (2002). Structural and functional consequence of missense mutation in exon 5 of the lipoprotein lipase gene. *J Lip Res.* 43:398-406.
- [94] Beg OU, Uddin M, Siddiqi AR. (1998). Analysis of Heparin-Binding Sites in Human Lipoprotein Lipase Using Synthetic Peptides. *J Protein Chem.* 17(8):807-15.
- [95] Wiebusch H, *et al.* (1992). Mutations in the lipoprotein lipase gene are not restricted to patients with typeI hyperlipidemia. *Circulation.* 86:I-609.
- [96] Foubert L, *et al.* (1994). An analysis of mutations underlying lipoprotein lipase deficiency in France. *Atherosclerosis.* 109:67.
- [97] Foubert L, *et al.* (1997). A single Ser259Arg mutations in the gene for lipoprotein lipase causes chylomicronemia in Moroccans of Berber ancestry. *Human mutation.* 10:179-185.

## Anexo A

### Inquérito clínico e declaração de consentimento informado dos casos índice

## Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Confidencial

Número do processo:  
Número da família:  
(A preencher pelo INSA)


### Identificação do caso-índice

Nome completo: \_\_\_\_\_

Morada: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Data de Nasc.: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Sexo:            Masculino ☐            Feminino ☐

Origem étnica (assinalar a opção adequada):

☐ Caucasiano            ☐ Asiático            ☐ Africano            ☐ outro

### Condições de colheita e envio das amostras

Devem ser feitas as seguintes colheitas em jejum

#### Doente índice:

4 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro  
10 mL (2x5mL) de sangue em tubos de EDTA

#### Famíliares:

4 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro  
5 mL de sangue em tubo de EDTA

Estas amostras devem ser enviadas em **correio azul**, em envelope almofadado ou numa caixa, bem envolvidas em algodão, acompanhadas por este formulário.

O tempo máximo entre a colheita das amostras e a sua análise não deverá ultrapassar os **dois dias**, o que implica que a amostra seja enviada logo após a colheita. Esta condição é de extrema importância para este estudo. Para qualquer informação complementar contactar: Dra. Mafalda Bourbon, Tel: 21-7526476/7519335.

# **Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar**

## **Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”**

### **Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido**

Para que se possa compreender e actuar a nível da prevenção das doenças cardiovasculares é necessário a realização de estudos de investigação nesta área. Alguns dos factores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares são a hipertensão arterial, a diabetes, o tabagismo e a hipercolesterolemia (dislipidemia). Algumas dislipidemias têm origem genética, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar. O objectivo deste estudo é determinar a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos com o diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, assim como aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pessoas afectadas. Para este estudo é necessária a colheita de duas amostras de sangue, cerca de 15 ml no total, para a determinação de parâmetros laboratoriais de relevância e extracção de DNA para estudos moleculares. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para os trabalhos de investigação acima referidos.

Estes estudos são confidenciais e o anonimato dos participantes está assegurado de acordo com as normas éticas dos estudos genéticos: os dados referentes à sua identidade não constarão das bases de dados do estudo. Apenas serão pedidas informações sobre alguns dos seus dados pessoais e elementos da sua história clínica importantes para este estudo. Como participante no estudo pode em qualquer altura ter acesso aos seus dados clínicos e moleculares, podendo exigir ser retirado do mesmo assim que o desejar. Os resultados obtidos serão enviados para o seu médico assistente.

Declaro que fui informado dos objectivos deste estudo e aceito participar nele. Autorizo o tratamento automatizado dos meus dados pessoais.

Localidade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Nome do Participante:

\_\_\_\_\_

Assinatura:

\_\_\_\_\_

(Em caso do caso-índice ser menor de 18 anos, um dos pais deve assinar para dar o seu consentimento)

Nome do Médico Assistente:

\_\_\_\_\_

Assinatura:

\_\_\_\_\_

# Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Confidencial

Número do processo:

Número da família

(A preencher pelo INSA)


Razão primária de inclusão no estudo:

(assinalar a opção adequada)

- ☐ Parente afectado
- ☐ Parente com doença coronária crónica
- ☐ Caso-índice tem doença coronária crónica
- ☐ Caso-índice sofre de outras doenças vasculares
- ☐ Sinais físicos
- ☐ Screening
- ☐ Outros

Critérios para admissão no estudo (segundo os critérios abaixo mencionados):

- ☐ Hipercolesterolemia familiar confirmada
- ☐ Hipercolesterolemia familiar possível

## Critérios para diagnóstico:

**Hipercolesterolemia familiar confirmada** é definida como:

- (a) **Crianças menores de 16 anos:** Colesterol total acima de 200 mg/dL (5,18 mmol/L) ou LDL colesterol acima de 120 mg/dL (3.10 mmol/L)  
**Adultos:** Colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) ou LDL colesterol acima de 190mg/dL (4.9 mmol/L)
- e
- (b) Xantomas nos tendões no caso-index ou parente (pais, filhos avós, irmãos, tios)
- ou
- (c) Evidência genética de mutação no receptor de LDL ou APOB

**Hipercolesterolemia familiar possível** é definida como:

- (a)
- e
- (d) História familiar de enfarte do miocárdio antes dos 50 anos em avós e tios ou antes dos 60 anos nos pais, irmãos e filhos
- ou
- (e) História familiar de nível elevado de colesterol nos pais, irmãos ou filhos; ou colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) nos avós e/ou tios.

## Identificação médica do caso-índice:

Nome, morada e telefone do médico assistente

--

Hospital

--

Número hospitalar do caso-índice

--

## História médica do caso-index

Valores antes do tratamento

Colesterol	LDL	HDL	TG	ApoB	ApoAI	Lp(a)

### **Xantomas nos tendões:**

(assinale se o caso índice alguma vez apresentou xantomas)

	Presente	Ausente		Presente	Ausente
Dorso da mãos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pretibiais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cotovelos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dorso dos pés	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Tendão de Achilles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### **Olhos**

	Presente	Ausente
<i>Lipaemia retinalis</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Arco corneano	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Xantelasma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Assinalar se o caso-index tem ou teve algumas das seguintes situações:

	Confirmado	Possível	
Angina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade de início (anos):_____
Enfarte do miocárdio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade do 1º enfarte:_____
CABG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando?_____
Angioplastia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando?_____
Outras doenças vasculares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando?_____
Hipertensão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
A.V.C.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade do 1ºA.V.C.:_____
A.I.T.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Claudicação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Pancreatite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doença da tiróide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doença renal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade de início (anos):_____
Tratamento da Diabetes:	Insulina	<input type="checkbox"/>	
	Oral	<input type="checkbox"/>	
	Insulina e oral	<input type="checkbox"/>	
	Dieta	<input type="checkbox"/>	

### Informação médica da consulta mais recente

Data: \_\_\_\_\_ Terapêutica: Sim ☐ Não ☐

Colesterol	LDL	HDL	TG	ApoB	ApoAI	Lp(a)

Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_

Pressão arterial: Sístole \_\_\_\_\_ Diástole \_\_\_\_\_

Álcool

Número de unidades por semana: \_\_\_\_\_

( 1 unidade = 1 cerveja ou um copo de vinho)

Fumador? Sim ☐ quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_

Não ☐ se é um ex-fumador há quantos anos deixou de fumar? \_\_\_\_\_

Faz exercício? Sim ☐ Que tipo de exercício? \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_

Não ☐

## História familiar do caso-índex

Parentesco	Colesterol elevado	Presença de xantomas	Trigliceridos elevado	Idade do 1º enfarte do miocárdio	Vivo (V) Morto (M) Desc.(?)	Idade presente ou na morte	Causa de morte
Pai Nome:	mg/dl		mg/dl				
Mãe Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Cônjuge Nome:	mg/dl		mg/dl				

Preencher com SIM e NÃO quando os valores não são conhecidos

Árvore genealógica

Tratamento:

Dieta ☐ LDL Aferese ☐

Medicamentos ☐

**Terapia actual para baixar os lípidos**

Estatinas ☐ Data do início do tratamento \_\_\_\_\_

Resinas ☐ Data do início do tratamento \_\_\_\_\_

Fibratos ☐ Data do início do tratamento \_\_\_\_\_

Ácido nicotínico  
ou derivado ☐ Data do início do tratamento \_\_\_\_\_

Inibidor da absorção  
intestinal do colesterol ☐ Data do início do tratamento \_\_\_\_\_

Outro ☐ Qual ? \_\_\_\_\_

Outras observações:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

A preencher pelo INSA

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Col.Total	LDL	HDL	TG	Lp (a)	Apo AI	Apo B



## **Anexo B**

**Tabela B1 – Primers utilizados na PCR do gene *LPL***

Região a amplificar	Designação do primer	Sequência 5' → 3' do primer	Dimensão do primer (bases)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (°C)	Mg <sup>2+</sup> (μl)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Promotor	F: MB134* R: MB135	AAACAGGATTCGTCAAAAGA CTAGAAGTGGGCAGCTTTC	20 19	62 68	55	1	334
Exão 1	F: MB102* R: MB103	GCCAATAGGTGATGAGGTTT CTTCTTCTCATCCTCAGTTCG	20 21	66 69	56	1	422
Exão 2	F: MB104* R: MB105	GTGGTTGCCTGTGAACCTA GCAGGCCAGTCAGGATAC	19 18	68 69	58	1	311
Exão 3	F: MB106* R: MB107	CAATGGGTTTCCAATCAAGT TTCTGGCTCCAGTCAAAAAC	20 20	64 66	54	1.5	353
Exão 4	F: MB108* R: MB109	GGCAGAACTGTAAGCACCT TCAGAATGACAGTCTTTTCACC	19 22	68 68	57	1.5	209
Exão 5	F: MB110* R: MB111	AGTGCATTCAAATGATGAGC TGGCCAAATGTGTATATGAAA	20 21	64 63	57	1.5	433
Exão 6	F: MB112* R: MB113	CCTATTTTAGACATGCCAAATG TGTTCGAATGGACAGAATC	22 19	66 63	54	1.5	414
Exão 7	F: MB114* R: MB115	TGAATTGCCTGACTATTTGG CTGCTCAGACCAAGGGTTAT	20 20	64 68	57	1	265
Exão 8	F: MB116* R: MB117	TTTGTTGGACATTTTTGTGC TGGGGGTCTAAAGTGAAGG	20 19	62 68	59	1	360
Exão 9	F: MB118* R: MB119	TCCTGACAGAACTGTACCTTTG ATGAAGCTGCCTCCCTTAG	22 19	69 68	57	1	248
Exão 10	F: MB120* R: MB121	ACAGGCGGGAATTGTAAAAC AACGTTGGAGGATGTGCTAT	20 20	66 66	58	1	300

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; *LPL*, *Lipas Lipoproteicae*; T<sub>m</sub>, Temperatura de *melting*; T<sub>a</sub>, Temperatura de *annealing*; Mg<sup>2+</sup>, Magnésio; pb, pares de bases; °C, Graus Celsius; μl, microlitro; F, *forward*; R, *reverse*; \*, *primers* utilizados também na sequenciação dos fragmentos obtidos por PCR.

**Tabela B2 – Primers utilizados na PCR do gene *APOA-IV***

Região a amplificar	Designação do primer	Sequência 5' → 3' do primer	Dimensão do primer (bases)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (°C)	Mg <sup>2+</sup> (μl)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Exão 1	F: MB136*	GAGTCACACTGAGGAAGGAG	20	70	56	1	313
	R: MB137	CATCCTGCACTACTCAGAGC	20	70			
Exão 2	F: MB138*	CTAAGCTCAGACAGGGAAAA	20	66	58	1	298
	R: MB139	TTTAAGAATTCCCCGTCAC	19	63			
Primeira porção do exão 3	F: MB140*	GAAGTCGGTACCTCTGAGC	19	70	56	1	451
	R: MB141	ACTCTCTCCATGCGCTGT	18	67			
Segunda porção do exão 3	F: MB142*	GACAACCTGCGAGAGCTT	18	67	56	1	500
	R: MB143	AGCTCTGCCAGTGACTTCT	19	68			
Terceira porção do exão 3	F: MB144*	CTTCCAGATGAAGAAGAACG	20	66	55	1	551
	R: MB145	CAGAACTTCTTTGGGACAGA	20	66			

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; *APOA-IV*, *Apolipoproteína A-IV*; T<sub>m</sub>, Temperatura de *melting*; T<sub>a</sub>, Temperatura de *annealing*; Mg<sup>2+</sup>, Magnésio; pb, pares de bases; °C, Graus Celsius; μl, microlitro; F, *forward*; R, *reverse*; \*, primers utilizados também na sequenciação dos fragmentos obtidos por PCR.

**Tabela B3 – Primers utilizados na PCR do gene *APOA-V***

Região a amplificar	Designação do primer	Sequência 5' → 3' do primer	Dimensão do primer (bases)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (°C)	Mg <sup>2+</sup> (μl)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Exão 1+2	F: MB146*	AGGGGTAACAGGATTTTCG	18	65	55	1	387
	R: MB147	CAGCTGTCTCCTCCCTTC	18	69			
Primeira porção do exão 3	F: MB148*	AAGGAGATGATGGAGGCTA	19	65	57	1	475
	R: MB149	GCGTATGGGTGGAAGAG	18	69			
Segunda porção do exão 3	F: MB150*	AGGAGCTGCAGGAGCAGT	18	69	58	1.5	432
	R: MB151	GCTGGACCTCCTCAGTCT	18	69			
Terceira porção do exão 3	F: MB152*	CACTGGGACTGAGGAAGG	18	69	56	1.5	392
	R: MB153	AAGGACTGAACCATGCTAGA	20	66			

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; *APOA-V*, *Apolipoproteína A-V*; T<sub>m</sub>, Temperatura de *melting*; T<sub>a</sub>, Temperatura de *annealing*; Mg<sup>2+</sup>, Magnésio; pb, pares de bases; °C, Graus Celsius; μl, microlitro; F, *forward*; R, *reverse*; \*, primers utilizados também na sequenciação dos fragmentos obtidos por PCR.

**Tabela B4 – Primers utilizados na PCR do gene *APOC-II***

Região a amplificar	Designação do primer	Sequência 5' → 3' do primer	Dimensão do primer (bases)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (°C)	Mg <sup>2+</sup> (μl)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Exão 5	F: MB154*	CACAGAGCAGGATCTCAGTC	20	70	55	1	227
	R: MB155	AAGATGCTTGGAGCTCATT	19	63			
Exão 6	F: MB156*	TCTTCTTCCTTCCTCCTTTC	20	66	56	1	280
	R: MB157	GATGCAGTCGGTGGTATG	18	67			
Exão 7	F: MB158*	TCAGACCCAGGAGTCCAG	18	69	57	1.5	250
	R: MB159	ATGCAAGAGCTACTGGGAAG	20	68			

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; *APOC-II*, *Apolipoproteína C-II*; T<sub>m</sub>, Temperatura de *melting*; T<sub>a</sub>, Temperatura de *annealing*; Mg<sup>2+</sup>, Magnésio; pb, pares de bases; °C, Graus Celsius; μl, microlitro; F, *forward*; R, *reverse*; \*, *primers* utilizados também na sequenciação dos fragmentos obtidos por PCR.

**Tabela B5 – Primers utilizados na PCR do gene *APOC-III***

Região a amplificar	Designação do primer	Sequência 5' → 3' do primer	Dimensão do primer (bases)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (°C)	Mg <sup>2+</sup> (μl)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Exão 2	F: MB160*	CCTTCTGAGAGCCCGTATTA	20	68	57	1	297
	R: MB161	CTGCTTGACCACCCATTG	18	67			
Exão 3	F: MB162*	CAATGGGTGGTCAAGCAG	18	67	57	1	288
	R: MB163	ATTCCATTGTTGGGATCTCA	20	64			
Exão 4	F: MB164*	GTGTGGTCCTGACTGGTG	18	69	55	1.5	448
	R: MB165	CAGACACAGATGGCACACT	20	68			

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; *APOC-III*, *Apolipoproteína C-III*; T<sub>m</sub>, Temperatura de *melting*; T<sub>a</sub>, Temperatura de *annealing*; Mg<sup>2+</sup>, Magnésio; pb, pares de bases; °C, Graus Celsius; μl, microlitro; F, *forward*; R, *reverse*; \*, *primers* utilizados também na sequenciação dos fragmentos obtidos por PCR.

**Tabela B6 – Primers utilizados na PCR do gene *USF1***

Região a amplificar	Designação do primer	Sequência 5' → 3' do primer	Dimensão do primer (bases)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>a</sub> (°C)	Mg <sup>2+</sup> (μl)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Região contendo o polimorfismo <i>usf1s2</i> no intrão 7	F: MB166*	GTAGAGACAGGGTTTCACCA	20	68	56	1	206
	R: MB167	TGGCCAGAGTAAGAAGACAA	20	66			
Região contendo o polimorfismo <i>usf1s1</i> no exão 11	F: MB168*	ACAGGGGGAAGTTCAGAAG	19	68	57	1	200
	R: MB169	AGCCCCAGAGTTTAGTGTGT	20	68			

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; *USF1*, *Upstream Transcription Factor 1*; T<sub>m</sub>, Temperatura de *melting*; T<sub>a</sub>, Temperatura de *annealing*; Mg<sup>2+</sup>, Magnésio; pb, pares de bases; °C, Graus Celsius; μl, microlitro; F, *forward*; R, *reverse*; \*, *primers* utilizados também na sequenciação dos fragmentos obtidos por PCR.

**Tabela B7 – Reagentes e quantidades utilizados na mistura de PCR**

Reagente	Volume (μl)
Mistura de dNTPs	4
10x NH4 <i>Reaction Buffer</i>	2.5
Mg <sup>2+</sup>	1-1.5 (Ver tabelas A1, A2, A3, A4, A5 e A6)
<i>Primer Forward</i> + <i>Primer Reverse</i>	1 + 1
<i>Biotaq DNA Polymorase</i>	0.125
Água estéril	Até perfazer o volume total
Volume Total (μl)	24

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; μl, microlitro; dNTPs, Desoxirribonucleótidos Fosfatados; Mg<sup>2+</sup>, Magnésio.

**Tabela B8 – Programa utilizado na PCR do gene *LPL***

Temperatura (°C)	Tempo	
95	3 minutos	
94	45 segundos	32 ciclos
54-59 (Ver tabela B1)	30 segundos	
72	1 minuto	
72	7 minutos	
4	∞	

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; LPL, Lipase Lipoproteica; °C, Grau Celsius; ∞, Infinito.

**Tabela B9 – Programa utilizado na PCR dos restantes genes em estudo**

Temperatura (°C)	Tempo	
95	3 minutos	
94	45 segundos	35 ciclos
55-58 (Ver tabela B2, B3, B4, B5 e B6)	30 segundos	
72	1 minuto	
72	7 minutos	
4	∞	

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; °C, Grau Celsius; ∞, Infinito.

**Tabela B10 – Reagentes, quantidades e programa utilizados na purificação dos produtos de PCR**

Reagente	Volume (μl)
Produto de PCR	2.5
Exo-Sap-IT®	1
Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
37	15
80	15
4	∞

PCR, *Polymerase Chain Reaction*; °C, Grau Celsius; μl, microlitro; ∞, Infinito.

**Tabela B11 – Reagentes e quantidades utilizados na mistura sequenciação**

Reagente	Volume (µl)
<i>BigDye</i>	2
<i>Primer</i> de sequenciação	1
Água estéril	Até perfazer o volume total
Volume Total (µl)	9

µl, microlitro.

**Tabela B12 – Programa utilizado na sequenciação de todos os genes em estudo**

Temperatura (°C)	Tempo	
96	30 segundos	
96	10 segundos	25 ciclos
54	5 segundos	
60	4 minutos	
4	∞	

°C, Grau Celsius; ∞, Infinito.

**Tabela B13 – Sondas MLPA do kit SALSA MLPA P218-B1 LPL**

Sonda SALSA MLPA	Dimensão da sonda (nucleótidos)	Posição Cromossomal Controlo	LPL
Fragmentos DQ-controlo	64-70-76-82		
Fragmentos DD-controlo	88-92-96		
Sonda Controlo 9817-L10227	154	9q34	
Sonda Controlo 9434-L09683	166	11q13	
<b>Sonda LPL 6896-L09363</b>	<b>175</b>		<b>Exão 8</b>
<b>Sonda LPL 7795-L09068</b>	<b>184</b>		<b>Exão 1</b>
Sonda Controlo 9049-L09303	196	4q35	
<b>Sonda LPL 6894-L09366</b>	<b>202</b>		<b>Exão 6</b>
<b>Sonda LPL 6892-L09367</b>	<b>211</b>		<b>Exão 4</b>
Sonda Controlo 9825-L11754	218	10q26	
Sonda Controlo 8679-L09778	226	13q32	
<b>Sonda LPL 6897-L09368</b>	<b>238</b>		<b>Exão 9</b>
<b>Sonda LPL 6891-L06471</b>	<b>247</b>		<b>Exão 3</b>
<b>Sonda LPL 6898-L06478</b>	<b>261</b>		<b>Exão 10</b>
<b>Sonda LPL 6893-L09369</b>	<b>274</b>		<b>Exão 5</b>
Sonda Controlo 9900-L10313	283	16p13	
<b>Sonda LPL 6890-L09370</b>	<b>292</b>		<b>Exão 2</b>
Sonda Controlo 9983-L10442	301	19p13	
Sonda Controlo 9065-L09234	310	19p13	

MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; LPL, Lipase Lipoproteica.

**Tabela B14 – Programa completo de MLPA**

1) Reacção de Hibridação		
Temperatura (°C)	Tempo	
98	5 minutos	
25	Pausa	
95	1 minuto	
60	Pausa	
2) Reacção de Ligação		
Temperatura (°C)	Tempo	
54	Pausa	
54	15 minutos	
98	5 minutos	
4	Pausa	
3) Reacção de PCR		
Temperatura (°C)	Tempo	
60	Pausa	
95	30 segundos	35 ciclos
60	30 segundos	
72	30 segundos	
72	20 minutos	
4	∞	

MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; °C, Grau Celsius; ∞, Infinito.